

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería Química

**“ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS
DE ORO UTILIZANDO EXTRACTO DE RASPO DE UVA”**



Memoria

Autor:	María Malínkina
Director:	Antonio Florido Pérez
Co-Director:	María del Rosario Martínez Martínez
Convocatoria:	Junio 2018

Resumen

En la presente investigación se obtuvieron nanopartículas (NPs) de oro de forma sintética (por vía húmeda) mediante reacción redox a temperatura de ebullición, partiendo de una disolución diluida de ácido tetracloroáurico ($\text{H[AuCl}_4\text{]})$) como precursor, en presencia de un reductor orgánico como citrato trisódico dihidratado.

Además, se ha realizado la síntesis verde de nanopartículas de oro utilizando extracto de raspo de uva como agente reductor y el mismo precursor del metal como en la síntesis química ($\text{H[AuCl}_4\text{]})$. Se ha estudiado la influencia de la concentración de ácido tetracloroáurico y la cantidad de extracto además de la temperatura. Las NPs obtenidas se caracterizaron por espectroscopia de UV-Vis, para observar la influencia de los distintos parámetros, así como su estabilidad en el tiempo. También se analizó el contenido de polifenoles en forma de equivalentes de ácido gálico (método Folin-Ciocalteu) de los diferentes extractos utilizados para determinar su influencia en la síntesis.

Los resultados mediante espectrofotometría UV-Visible, demostraron que, a mayor cantidad de oro, mayor cantidad de nanopartículas y además se ha observado un desplazamiento del máximo de absorción a longitudes de onda mayores, lo que indica que el tamaño de nanopartícula era mayor.

Finalmente, las nanopartículas obtenidas se han caracterizado mediante microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM), que es la única técnica avanzada de caracterización que permite caracterizar de una manera precisa el tamaño y distribución de las nanopartículas de oro. Los resultados han permitido confirmar la presencia de nanopartículas de oro de pequeño tamaño y la estabilidad de la disolución coloidal en el tiempo.

En conclusión, se ha podido comprobar la eficacia del extracto de raspo de uva en la síntesis de nanopartículas de oro, por lo que, se podría usar esta metodología ambientalmente amigable en las áreas relacionadas con la nanotecnología.

Agradecimientos

Quisiera dar las gracias a todos aquellos que de alguna forma han compartido este camino conmigo.

En primer lugar, a los directores de este trabajo, la Prof. Dra. María del Rosario Martínez Martínez y Dr. Antonio Florido Pérez, tanto por brindarme la oportunidad de entrar en su grupo de investigación como por estar siempre ahí para ofrecerme sus consejos; por sus conocimientos y orientación, que han sido claves en la ejecución de este proyecto. También agradezco a mis profesores de asignatura e investigadores, la Alexandra Espriu Gascon y Karina Torres Rivero, por darme parte de su tiempo para apoyarme en la realización del presente trabajo.

Al resto de compañeros de mi grupo de investigación por su apoyo y por los buenos momentos que me han hecho pasar.

A todos y cada una de las personas pertenecientes al equipo del laboratorio de ingeniería química por la ayuda prestada, por los equipos facilitados y la sonrisa cálida que les caracteriza.

A Trifon Todorov Trifonov y a su equipo de trabajo, por su ayuda en la realización de micrografías a través de microscopía electrónica de transmisión por barrido y por su excelente disposición.

A Vitaliy Rogovyk le doy gracias por haberme acompañado a lo largo de todos estos años de carrera, por ser parte de mi vida apoyándome en cada momento.

Muchas Gracias.

Glosario

AuNPs: Nanopartículas de Oro

LSPR: *Localized surface plasmon resonance* (Plasmones de Resonancia Localizados en Superficie)

RFDI: *Radio Frequency Identification* (Identificación por radiofrecuencia)

BF: *Bright Field* (Campo Claro)

DF: *Dark Field* (Campo Oscuro)

EDS: *Energy Dispersive Spectroscopy* (Espectroscopía de Rayos X)

NIR: *Near-infrared spectroscopy* (Región espectral del Infrarrojo Cercano)

SEM: *Scanning Electron Microscope* (Microscopio Electrónico de Barrido)

STEM modificado: *Scanning transmission electron microscope* (Microscopio Electrónico de Transmisión de Barrido)

TEM: *Transmission Electron Microscopy* (Microscopio Electrónico de Transmisión)

UV-vis: Ultravioleta-Visible

Índice

“ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS	I
DE ORO UTILIZANDO EXTRACTO DE RASPO DE UVA”	I
RESUMEN	3
AGRADECIMIENTOS	4
GLOSARIO	5
1. PREFACIO	8
1.1 Origen del proyecto	8
1.2 Motivación	8
2. OBJETIVOS Y ALCANCE DEL PROYECTO	9
2.1 Objetivo principal	9
2.2 Objetivos específicos	9
2.3 Alcance del proyecto	10
3. INTRODUCCIÓN	11
3.1 Nanotecnología	11
3.2 Nanopartículas metálicas	12
3.3 Nanopartículas de oro (AuNPs): propiedades, síntesis y aplicaciones.....	13
3.3.1 Propiedades de AuNPs	13
3.3.2 Aplicaciones de AuNPs	15
3.3.3 Síntesis de AuNPs	16
3.4 Síntesis verde de nanopartículas.....	20
3.4.1 Polifenoles	20
3.5 Técnicas de caracterización de nanopartículas	21
4. PARTE EXPERIMENTAL	24
4.1 Síntesis química	24
4.1.1 Reactivos, material e instrumentación	25
4.1.2 Procedimiento experimental	25
4.2 Discusión de los resultados de la Síntesis Química.....	28
4.2.1 Mediante Espectroscopia UV-Vis.....	28
4.2.2 Mediante Microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM)	30
4.3 Síntesis Verde	32

4.3.1 Reactivos, material e instrumentación.....	32
4.3.2 Adecuación del raso de uva.....	32
4.3.3 Preparación del extracto de raso de uva.....	35
4.3.4 Preparación de nanopartículas de oro	36
4.4 Discusión de los resultados de la Síntesis Verde.....	40
4.4.1 Síntesis a un volumen constante de la disolución del extracto a Tamb.	40
4.4.2 Mediante Microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM)	44
4.4.2 Síntesis a un volumen constante del extracto a T50°C y T80°C	46
4.4.3 Síntesis a un volumen constante del extracto a Tamb., T50°C y T80°C	51
4.4.4 Síntesis a un volumen constante de la disolución de oro a Tamb.	58
4.5 Determinación de polifenoles en extracto de raso de uva.....	67
4.3.1 Reactivos, material e instrumentación.....	67
4.3.2 Procedimiento experimental.....	67
4.3.3 Recta de calibrado mediante espectroscopia UV-Vis	68
4.3.4 Concentración de polifenoles en extracto	70
CONCLUSIONES	73
PRESUPUESTO ECONÓMICO	75
BIBLIOGRAFIA	77

1. Prefacio

1.1 Origen del proyecto

El proceso de síntesis de nanomateriales puede generar residuos contaminantes, sería muy importante contar con un protocolo de síntesis verde de nanopartículas, cuyos desechos sean amigables con el medio ambiente. En el presente trabajo se propone una síntesis de nanopartículas metálicas en la que se sustituyen los agentes reductor y estabilizante por extractos vegetales.

El presente Trabajo de Fin de Grado forma parte del proyecto de investigación: “Síntesis verde de nanopartículas metálicas a partir de aguas ácidas de mina y extractos de residuos agroalimentarios”, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid y fondos FEDER, EU, 2016-2018 (proyecto CTM2015-68859-C2-2-R; MINECO/FEDER). El proyecto se desarrolla en el grupo de Resource Recovery and Environmental Management (R2EM) del departamento de Ingeniería Química de la Universitat Politècnica de Catalunya-Barcelona Tech (UPC), en colaboración con la Universitat de Girona (UdG).

1.2 Motivación

Las nanopartículas de oro (AuNPs) exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico. Además, pueden ser producidas en distintos tamaños y formas y pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético). Debido a los grandes avances, existe una imprescindible necesidad de síntesis de dichas partículas. El método de Turkevich (vía húmeda) es muy eficiente, pero tiene por defecto el generar residuos tóxicos. Lo que ha despertado el interés por orientar las investigaciones en el campo de la química verde o “green chemistry”. La cuál se fundamenta de criterios que contrarrestan puntos no favorables del método de síntesis habitual.

La eliminación de contaminantes se logra sustituyendo el agente reductor por uno no tóxico al medio ambiente. Los componentes reductores en la naturaleza son mayormente enzimas, aminoácidos, vitaminas, proteínas, polisacáridos, y grupos fenol. En nuestro caso, se ha planteado una investigación sobre la síntesis de nanopartículas de oro utilizando un extracto natural obtenido a partir del raspo de la uva. La aplicación de esta tecnología abre las puertas a una nueva era de fabricación responsable con el medio ambiente de partículas a escala nanométrica.

2. Objetivos y alcance del proyecto

2.1 Objetivo principal

El principal objetivo del presente proyecto final de grado (TFG) es encontrar las condiciones experimentales óptimas para establecer un protocolo para sintetizar y caracterizar nanopartículas de oro, así como explorar la posibilidad de controlar el tamaño y la forma, usando extracto de raspo de uva, es decir, la estructura vegetal del racimo como reactivo reductor y estabilizando la disolución acuosa de oro como precursor del metal.

Este objetivo principal se perseguirá a través de los siguientes objetivos específicos.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar las nanopartículas de oro mediante reacciones de óxido-reducción partiendo de disolución de ácido tetracloroaurico ($\text{H}[\text{AuCl}_4]$) como precursor del metal, en presencia de reductor orgánico, como citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) y analizar los resultados obtenidos mediante técnicas de caracterización.
- Realizar síntesis de nanopartículas de oro utilizando extracto de raspo de uva como reductor y a diferentes temperaturas para determinar la influencia tanto de la concentración del extracto como de la cantidad de oro en la concentración, morfología y tamaño de las nanopartículas obtenidas.
- Determinar cómo influye la concentración de polifenoles del extracto del raspo de uva usado en la síntesis de nanopartículas de oro.
- Determinar las nanopartículas sintetizadas mediante espectroscopia UV-vis
- Evaluar la estabilidad en el tiempo de las soluciones coloidales de nanopartículas de oro obtenidas mediante espectroscopia Ultravioleta-Visible.
- Analizar por microscopía electrónica de transmisión por barrido las disoluciones de NPs de Au para monitorear su diámetro medio.

2.3 Alcance del proyecto

En el presente TFG, se hace énfasis únicamente en la síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro mediante diferentes técnicas microscópicas para determinar el tamaño y distribución de las nanopartículas sintetizadas.

La cantidad de compuestos orgánicos en el extracto de raspo de uva no se han estudiado debido a que ya se han determinado en estudios previos (1) (2) (3), sin embargo, se ha observado la evolución del potencial de reducción y pH de las nanopartículas.

La separación, aplicaciones y gestión final no forman parte del trabajo, pero están pensadas como una continuación del mismo.

3. Introducción

3.1 Nanotecnología

Según la Royal Society of London, la nanotecnología es “la ciencia que se encarga del diseño, caracterización y aplicación de nuevas estructuras, dispositivos y sistemas, mediante el control de la forma y tamaño de la materia a escala nanométrica, entre 100 y 0,1 nm (4). La nanotecnología abarca una amplísima diversidad de aplicaciones en distintos campos como la cosmética, electrónica y la construcción entre otros.

Hay diferentes clasificaciones de los nanomateriales de acuerdo a sus dimensiones (Figura 1):

- 0D (Cero-dimensional): son los materiales con todas sus dimensiones (x, y, z) dentro de la nanoescala. La mayoría de estos materiales son de forma esférica; sin embargo, formas cúbicas y poligonales con dimensiones nanométricas también se encuentran bajo de esta clase. Dentro de esta categoría se encuentran: nanopartículas, puntos cuánticos (quantum dots).
- 1D (Uni-dimensional): son materiales con dos dimensiones (x, y) en la nanoescala y la otra dimensión es de mayor tamaño que la escala nanométrica (>100nm). Algunos ejemplos de estos tipos de materiales son los nanocables, nanobarillas, nanotubos, fibras.
- 2D (Bi-dimensional): son materiales con una dimensión en la escala nanométrica, y dos dimensiones fuera de este intervalo. Estos nanomateriales, exhiben forma de placas. Algunos ejemplos son: nanoláminas, nanocapas, películas poliméricas (nanofilms).
- 3D (Tri-dimensional): son materiales que tienen sus tres dimensiones por fuera de la escala nanométrica (>100nm). Estos materiales poseen una estructura nanocristalina o presentan características a nanoescala. También se encuentran los materiales compuestos por diferentes bloques de nanomateriales (nanoestructurados), por ejemplo, múltiples arreglos de nanocristales, esqueletos de fibras y nanotubos. Algunas de estas estructuras son las nanobolas y nanoflores de NiO.

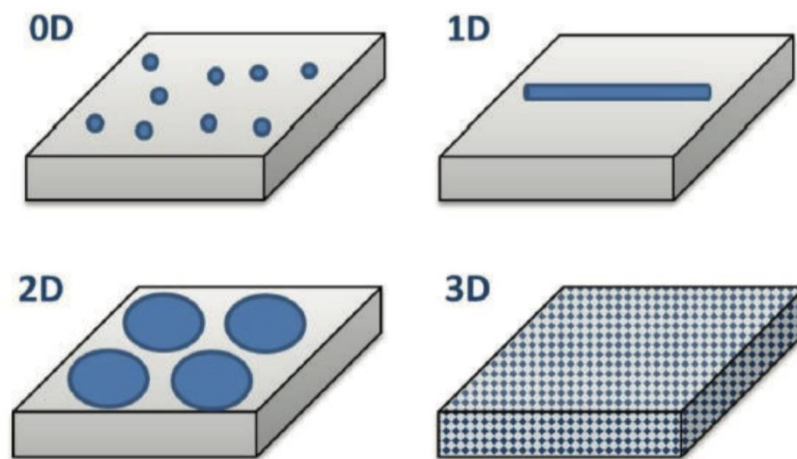


Figura 1. Clasificación de nanomateriales de acuerdo a su dimensionalidad.

3.2 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas constituyen la base de las nanoestructuras y son mucho más pequeñas que los objetos de uso diario; pero son más grandes que un átomo o una molécula (5). Las nanopartículas de metales nobles han atraído la atención de los científicos desde la antigüedad debido a sus propiedades ópticas únicas dependientes de la forma y del tamaño de las mismas (6). Hasta donde se tienen registros, la copa de Licurgo es uno de los objetos más antiguos que contienen nanopartículas. La copa fue elaborada por los romanos en el siglo IV d.C. El proceso que los romanos seguían para la elaboración de sus vidrios, propició la síntesis de nanopartículas de oro-plata. Las presencias de las mismas en la copa tienen como efecto que se aprecie en diferentes colores. El color de la copa dependerá de cómo sea iluminada; estando la fuente de luz en el exterior la copa tendría un color verde amarillento (Figura 2a), pero si se encuentra en el interior ésta se torna de color rojizo (Figura 2b) (7) (8).



Figura 2. Copa de Licurgo. (a) Copa iluminada desde el exterior. (b) Copa iluminada desde el interior. Imagen tomada de la revista del Smithsonian (9).

Pero no fue hasta hace 100 años cuando se comenzó con la experimentación de estas nanoestructuras, después de que Faraday realizara el primer experimento en el que sintetizó coloides de oro puro por reducción química de una disolución de cloroaurato de sodio (10). Turkevich reportó un método rápido y sencillo para la síntesis de nanopartículas; además demostró qué proporciones de reductor/precursor son óptimas para obtener diámetros específicos (11). La desventaja de su método es que genera residuos tóxicos al medio ambiente. Por ello la investigación actual consiste en la búsqueda de métodos “verdes” de síntesis mediante compuestos capaces de efectuar la misma función que los reactivos químicos con cierta toxicidad, pero que sean amigables con el ambiente.

De entre todos los metales nobles, el oro ha sobresalido por sus interesantes propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas, catalíticas, biocidas y antimicrobianas pudiéndose aplicar en distintas áreas tales como en farmacología, medicina, industria alimentaria, tecnología, biología.

3.3 Nanopartículas de oro (AuNPs): propiedades, síntesis y aplicaciones

3.3.1 Propiedades de AuNPs

Las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan unas propiedades únicas que difieren de aquellas que presenta el oro macroscópico (bulk gold):

- **Plasmón de Resonancia:** Las propiedades ópticas de las AuNPs son de gran interés, debido a la formación de Plasmones de Resonancia Localizados en Superficie (LSPR), oscilaciones colectivas de los electrones de la banda de conducción de los átomos de oro al ser excitados por un haz de luz de longitud de onda (λ) concreta. En el caso de las nanopartículas de oro esféricas menores de 50 nm de diámetro, la λ que genera el Plasmón es de aproximadamente 520 nm, aunque dicha longitud de onda varía según el tamaño, la forma, el tipo de funcionalización, el ambiente dieléctrico y el grado de agregación de las nanopartículas (12).

Esta propiedad es muy útil para la detección de sustancias a muy baja concentración, las cuales alteran el ambiente dieléctrico local de las nanopartículas (chemical sensing) (13), o para posibles terapias por ablación fototérmica contra el cáncer, ya que al excitar las AuNPs a dicha longitud de onda, liberan una gran cantidad de calor localizado en puntos concretos del organismo (14).

- **Biocompatibilidad y baja citotoxicidad:** Las nanopartículas de oro sin funcionalizar presentan una baja citotoxicidad y una buena compatibilidad biológica. Gracias a ello se pueden llevar a cabo métodos diagnósticos y terapias *in vivo* sin un elevado riesgo de que la partícula cause problemas al organismo (15).

- **Tamaño y forma variable:** Según el método empleado para sintetizar las AuNPs, se puede obtener una amplia variedad de nanopartículas con tamaños y formas diferentes. Las propiedades ópticas y funcionales varían en función de su tamaño y forma (e.g. la longitud de onda de excitación plasmónica, vide supra) (12). En la (Figura 3) podemos observar varias AuNPs con formas muy variadas.

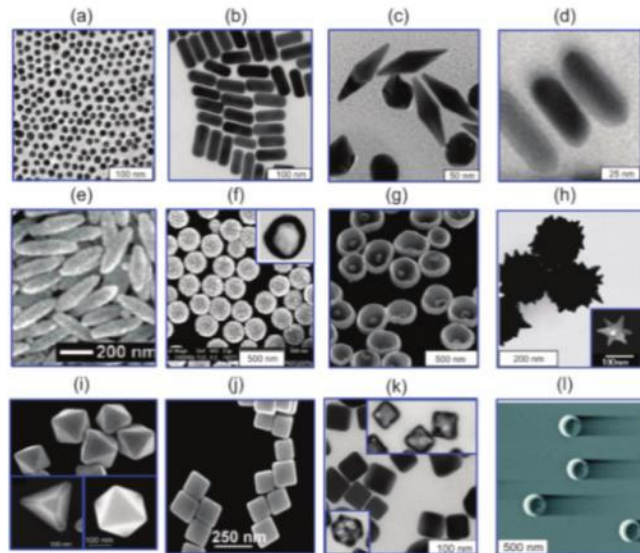


Figura 3. Imágenes tomadas mediante TEM de nanopartículas de oro (AuNPs) con distintas formas: (a) Esferas; (b) Bastones o “rods”; (c) Bipirámides; (d) Bastones de oro cubiertos de plata; (e) “Arroz” (f) Shells de SiO₂/Au; (g) Cuencos; (h) Shells de SiO₂/Au (i) Tetrahedros, Octaedros y Cubotetrahedros; (j) Cubos; (k) Cajas de Oro/Plata; (l) Nanolunas. (Dykman & Khlebtsov 2012) (12).

- **Funcionalización sencilla:** La funcionalización consiste en unir moléculas a la superficie de la nanopartícula para que ésta adquiera una función específica. Los átomos de oro presentes en la superficie de las AuNPs pueden adsorber por adsorción física otras moléculas mediante interacciones no covalentes o bien adsorber por adsorción química mediante enlaces covalentes (gracias a los orbitales híbridos 5d-6s formados por los átomos de oro superficiales), donde el enlace covalente es el más fuerte que se conoce en este tipo de nanopartículas (16). Las moléculas funcionalizadoras pueden otorgar a la AuNP diversas propiedades, como mayor estabilidad, biocompatibilidad o poder antineoplásico entre otras muchas funciones.

Todas estas propiedades hacen que las AuNPs sea unas prometedoras herramientas terapéuticas y de diagnóstico. Múltiples estudios están demostrando el papel diagnóstico de las AuNPs como biosensores (detección de patógenos en sangre, niveles de glucosa u otros metabolitos...) y como agentes para obtener bioimágenes (tomografía computerizada, RMN, fotoacústica, microscopía de

fluorescencia...) (12) (17). En cuanto a su potencial terapéutico, se están diseñando nuevos sistemas liberadores de medicamentos a partir de AuNPs para combatir el cáncer, el VIH y la diabetes entre otras enfermedades. Además, el LSPR generado por las AuNPs está permitiendo diseñar prometedoras terapias contra el cáncer mediante ablación fototérmica (12).

3.3.2 Aplicaciones de AuNPs

Aunque pueda parecerlo, la utilización de oro con fines médicos no es nueva, sino que se remonta a la antigüedad, existiendo constatación de la utilización de oro coloidal en China en el año 2500 antes de Cristo. El descubrimiento por Robert Koch del efecto bacteriostático del cianuro de oro frente al bacilo de la tuberculosis, marca el comienzo de su utilización en la medicina moderna siendo introducido en la terapia de la tuberculosis en 1920 (18).

Hoy en día, las nanopartículas de oro destacan especialmente por sus propiedades fototerapéuticas. En presencia de luz láser las AuNPs se activan y desprenden calor, siendo muy útiles en el tratamiento selectivo de células tumorales (19). Por ello, en los últimos años se han realizado notables esfuerzos en la investigación y en la aplicación de las AuNPs para la detección precoz, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

Además de su extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos, las AuNPs pueden utilizarse en la elaboración de partículas nanoestructuradas para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas terapéuticas, así como en terapia génica (vehiculización de plásmidos, DNA, RNA, etc.) (20). También destaca el empleo de las AuNPs en la elaboración de sistemas transportadores inteligentes que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo, la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya sea por activación de un estímulo biológico interno o externo (21) (22).

Otro importante campo de aplicación de las AuNPs es la industria de los alimentos, donde se las utiliza como parte integrante de nanocompuestos poliméricos. Éstos (que además de AuNPs pueden incluir otras nanopartículas de plata, de óxido de zinc o de óxido de aluminio) se utilizan en la fabricación de envases con propiedades antimicrobianas o para incrementar la resistencia a la abrasión de los envases (23). Asimismo, ya se han elaborado indicadores de tiempo-temperatura a partir de AuNPs (24). La empresa Timestrip UK Ltd. ha desarrollado un dispositivo a partir de oro coloidal, que permite establecer si los alimentos procesados y congelados, han sido mantenidos a temperatura adecuada a lo largo de la cadena de producción y distribución. El funcionamiento de este dispositivo adherido al envase, se basa en un fenómeno simple, ya que a temperaturas inferiores a la de congelación, se produce una aglomeración irreversible de las AuNPs dando lugar a una disolución transparente. Por otra parte, cuando la temperatura sobrepasa el valor establecido, las AuNPs coloidal se dispersan en la suspensión, dando como resultado un color rojo intenso.

Una de las aplicaciones más interesantes de las AuNPs en el sector alimentario es el desarrollo de etiquetas de identificación por radiofrecuencia (RFID). Estos dispositivos permiten monitorizar determinados ítems a lo largo de toda la cadena de suministro, aumentando la eficacia y la rapidez de la distribución de los productos. Para la impresión de estas etiquetas se utilizan materiales con propiedades electrónicas muy particulares, como AuNPs, de plata y de cobre (25).

Actualmente, existen un gran número de investigaciones por su aplicación medioambiental, como por ejemplo la personalización de sensores utilizando nanopartículas, obteniendo así una optimización de la señal que emite el electrodo, transformándolo para detectar de manera más eficaz los iones de interés (26).

3.3.3 Síntesis de AuNPs

3.3.3.1 Métodos para sintetizar AuNPs

En la fabricación de nanomateriales se pueden distinguir dos estrategias (Figura 4) (27):

- **Las técnicas top-down** (de arriba abajo), consisten en la descomposición de grandes piezas de material para generar a partir de ellas las nanoestructuras requeridas. Por ejemplo: la molienda mecánica, la ablación láser, la descomposición térmica, la pulverización catódica.
- **Las técnicas bottom-up** (de abajo a arriba) que consisten en el ensamblaje de átomos y moléculas individuales para dar nanoestructuras de mayor tamaño. Por ejemplo: la precipitación química, la deposición de vapor, la condensación de átomos o moléculas, los procesos sol-gel, biosíntesis.

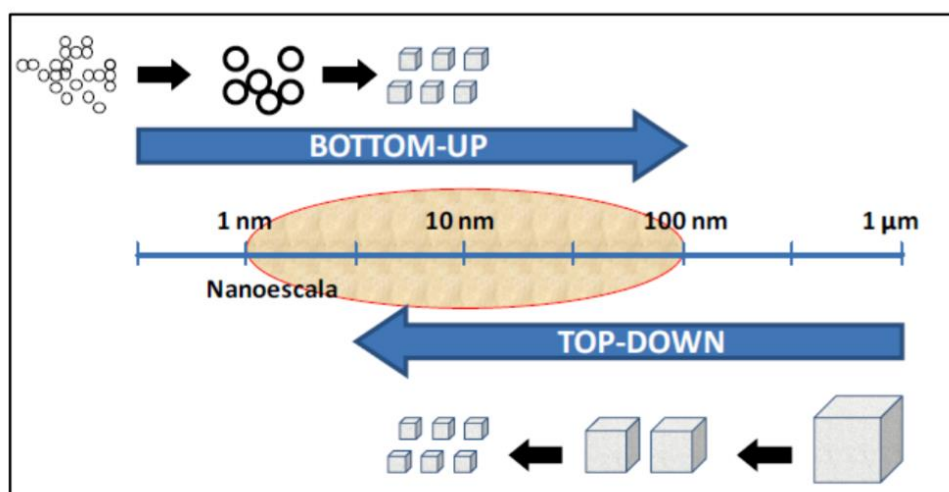


Figura 4. Técnicas de síntesis de nanomateriales

Se han desarrollado una gran variedad de métodos para sintetizar nanopartículas metálicas de distintas morfologías, de los cuales los más habituales son los métodos bottom-up. Estos métodos, de manera general, se puede clasificar en tres grupos: métodos químicos, métodos físicos y métodos biológicos.

- **Métodos químicos:** Son los más utilizados en la actualidad. La reducción química de sales de metales de transición en presencia de moléculas estabilizadoras es el método químico más popular para la preparación de nanopartículas metálicas. Para llevarlo a cabo es necesario el empleo de un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizante (28). El método de reducción química más extendido es la síntesis coloidal, ésta técnica consiste en la reducción de iones metálicos a átomos cerovalente que inmediatamente actúan como centros de nucleación para dar lugar a la formación de clusters (aglomeración de átomos metálicos) que continúan creciendo a medida que se siguen agregando más átomos.

Las principales ventajas de este método son (29):

- Es muy simple y reproducible.
 - Permite obtener nanopartículas homogéneas.
 - Permite preparar nanopartículas a gran escala y con una distribución de tamaño estrecha.
 - La estructura, el tamaño y la forma de las partículas pueden ser controladas variando simplemente las condiciones de preparación como el tipo de reductor, el contenido de los iones metálicos, la temperatura, la velocidad de agitación.
 - Las soluciones de las nanopartículas son estables por meses y presentan extraordinarias propiedades para diversas aplicaciones.
 - Se pueden preparar nanopartículas monometálicas y multimetálicas.
- **Métodos físicos:** La formación de nanopartículas mediante métodos físicos consta de varias etapas: la vaporización por diversas técnicas de un sustrato, la condensación de los átomos para formar el núcleo inicial, el crecimiento del núcleo por la adición de más átomos y la coalescencia (30).
Entre los métodos físicos se encuentran la ablación láser, termólisis e irradiación con microondas.
- **Métodos biológicos (Green chemistry):** Con el objetivo de sintetizar nanopartículas sin el uso reactivos tóxicos y costosos que puedan dificultar su aplicación biomédica, se están desarrollando nuevos métodos para sintetizar AuNPs con tamaños y formas bien definidas

mediante el uso de extractos de plantas (que contienen agentes reductores y estabilizadores naturales) y de microorganismos (levaduras o bacterias) con capacidad reductora natural.

En la **Tabla 1** hemos recopilado varios de los métodos químicos, físicos y biológicos más comunes para la síntesis de AuNPs:

Tipo de método	Nombre del método	Agente precursor	Agente reductor	Agente estabilizante	Tamaño (nm) y forma	Ref.
Químico	Turkevich/Frens	HAuCl ₄	Citrato de trisodio	Citrato de trisodio	10 – 20 Esféricas	33,34
	Brust/Schiffrin	HAuCl ₄	NaBH ₄	1-Dodecanotiol	1 – 3 Esféricas	35
	Martin	HAuCl ₄	NaBH ₄	1-Dodecanotiol	3.2 -5.4 Esféricas	36
	Navarro	HAuCl ₄	Acetilacetato + Citrato de trisodio	Citrato de trisodio	13 – 90 Esféricas	37
Físico	Irradiación-γ	HAuCl ₄	Rayos-γ	Alginato de sodio	5 – 40 Esféricas	38
	Electroquímico	Ánodo de oro	Cátodo de platino	TTAB	8.3 – 58.3 Esféricas	39
	Fotoquímico	HAuCl ₄	Radiación UV (254 nm)	CTAC	20 x 1000 Bastones	40
	Ablación láser ("Top-Down")	Placa de oro (99,99%)	Láser Yb:KGW	PEG/Dextrano	4 – 46 Esféricas	41
Biológico	Vía Verde	HAuCl ₄	Extracto	Extracto	< 20 Esferas y triángulos	42
	Microbiológico	HAuCl ₄	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	7.3 – 7.6 Esféricas	43

Tabla 1. Métodos para la síntesis química, física y biológica de AuNPs.

PEG: Polietilenglicol; TTAB: Bromuro de Trimetilamonio; CTAC: Cloruro de Cetilmetilamonio;

HAuCl₄: Ácido Tetracloroáurico

3.3.3.2 Mecanismo de síntesis y formación de NPs

En este proyecto se realizará la síntesis de nanopartículas de oro cuyo proceso consta de las etapas (31) (Figura 5):

- Obtención de átomos metálicos en estado de oxidación cero, Au (0), mediante reacciones de oxidación-reducción.
- **Nucleación:** En esta etapa dos o más átomos chocan y se unen para formar un cúmulo. El núcleo crítico es el tamaño más pequeño del cúmulo que es estable para las condiciones experimentales en que se realiza la síntesis de nanopartículas. A partir de este tamaño se considera que se inicia el crecimiento de la nanopartícula.

- **Crecimiento:** Se adicionan los núcleos de Au (0) unos a otros para dar lugar a la formación de la nanopartícula. Se produce por agregación de átomos provenientes de la etapa de reducción y cúmulos ya existentes, o bien por colisión entre cúmulos.
- **Adsorción de un agente estabilizante:** Las partículas metálicas en disolución tienden a aglomerarse debido a las interacciones de Van der Waals, por lo que es primordial estabilizarlas adicionando diferentes agentes estabilizantes (32) que controlen tanto la velocidad de reducción de los iones metálicos como el proceso de agregación de los átomos metálicos al neutralizar las fuerzas electrostáticas.

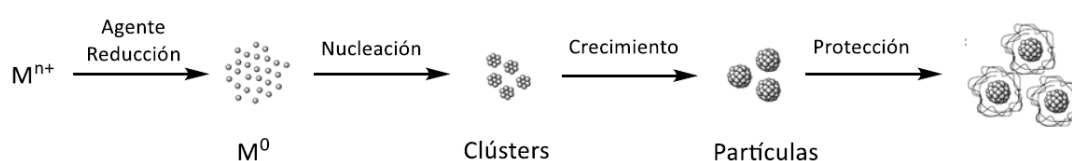


Figura 5. Proceso de formación de nanopartículas metálicas.

3.3.3.3 Parámetros de control de la reacción

Las características más significativas de las nanopartículas son su tamaño y su forma (44). De esa manera, una alternativa es su control indirecto mediante la modificación de otros parámetros, aunque no todos estos factores tienen siempre la misma importancia:

- **Temperatura de síntesis:** El aumento de la temperatura de síntesis aumenta el ratio de nucleación (45), lo que provoca que las nanopartículas sean más pequeñas, ya que todos los núcleos consumen iones metálicos al mismo tiempo.
- **Tiempo de reacción:** Interviene en mayor medida en el tamaño de nanopartícula, ya que parando la reacción o alterando sus condiciones se puede evitar acabar la fase de crecimiento en las condiciones iniciales. Los cambios de color y la medición del espectro UV-Vis pueden indicar indirectamente el crecimiento de las nanopartículas (46).
- **Concentración:** Si la concentración de catión metálico está por encima de una concentración crítica, la nucleación está favorecida (47). Una nucleación favorecida causa una disminución en el tamaño medio de las nanopartículas y un aumento en su número.

- **pH:** Los cambios del pH modifican el contenido de fitoquímicos de los extractos vegetales, y por consiguiente su capacidad para reducir y estabilizar nanopartículas (45).
- **Potencial electroquímico:** El potencial electroquímico del ion condiciona la efectividad de la síntesis de las nanopartículas (45). El extracto, dependiendo de su composición, tendrá más o menos facilidad para reducir los cationes metálicos.

3.4 Síntesis verde de nanopartículas

La síntesis verde es útil no sólo debido a su menor impacto ambiental en comparación con algunos de los métodos de producción físico-químicos, sino también porque puede ser usado para producir grandes cantidades de nanopartículas que estén libres de contaminación y que tienen un tamaño y morfología bien definida (27).

3.4.1 Polifenoles

Los extractos de plantas que contienen compuestos como los polifenoles actúan reduciendo metales y estabilizando las nanopartículas metálicas; además de que los residuos que generan son relativamente inocuos y fáciles de tratar (48).

Los polifenoles son constituyentes fundamentales del mundo vegetal, se encuentran comúnmente en los alimentos retardando o previniendo su oxidación. Están representados por centenares de compuestos de diversa estructura química, pero que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos que llevan asociados uno o varios grupos hidroxilo.

Uno de los métodos más utilizados para el análisis de compuestos fenólicos totales es el de Folin-Ciocalteu. Éste se basa en que los polifenoles reaccionan, en medio básico, con el reactivo Folin-Ciocalteu dando lugar a una coloración azul, la cual puede ser determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 765 nm. El reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido formado por las dos sales en el medio ácido (ácido fosfomolibdotúngstico), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para determinar el contenido de polifenoles (Figura 6) (49).

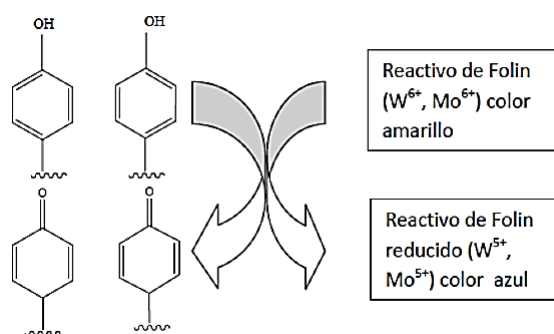


Figura 6. Mecanismo de reacción del reactivo Folin-Ciocalteu (49).

El ácido gálico (Figura 7), se utiliza como equivalente de contenido de polifenoles. Dado que el ensayo mide todos los compuestos fenólicos, la elección de ácido gálico como estándar se basa en la disponibilidad de una sustancia estable y pura. Además, la respuesta del ácido gálico se ha demostrado que es equivalente a la mayoría de los compuestos fenólicos en el raspo sobre una base de masa. También se ha probado la estabilidad de las disoluciones de ácido gálico estándar, las cuales pierden menos del 5% de su valor en más de dos semanas si se refrigera y se mantiene bien cerrado. Además, es barato, soluble en agua, se puede recrystalizar y secar fácilmente y es estable en la forma seca (50).

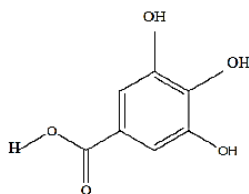


Figura 7. Ácido gálico (49).

3.5 Técnicas de caracterización de nanopartículas

Las nanopartículas de oro se encuentran en dispersión acuosa, por lo que el uso de un espectrofotómetro UV-Vis para su caracterización es viable. Sin embargo, para caracterizar con un microscopio electrónico de transmisión por barrido (STEM) la muestra deberá de prepararse adecuadamente. Ambas técnicas son las que se usaron para caracterizar las nanopartículas obtenidas en el laboratorio:

- **Espectrofotometría UV-Visible** comparando la radiación luminosa absorbida o transmitida por una solución respecto de un blanco, permite obtener información acerca de la concentración (absorbancia en el pico de máxima absorción), tamaño (posición del pico) y homogeneidad de tamaños (ancho del pico) de la muestra. El rango de longitudes de onda que maneja el equipo (Figura 8) van desde los 200 nm hasta 800 nm.

De 200-400 nm corresponde a luz ultravioleta y de 400-800 nm a luz visible. Para cada longitud de onda, la muestra tendrá un valor de absorbancia asociado (51).

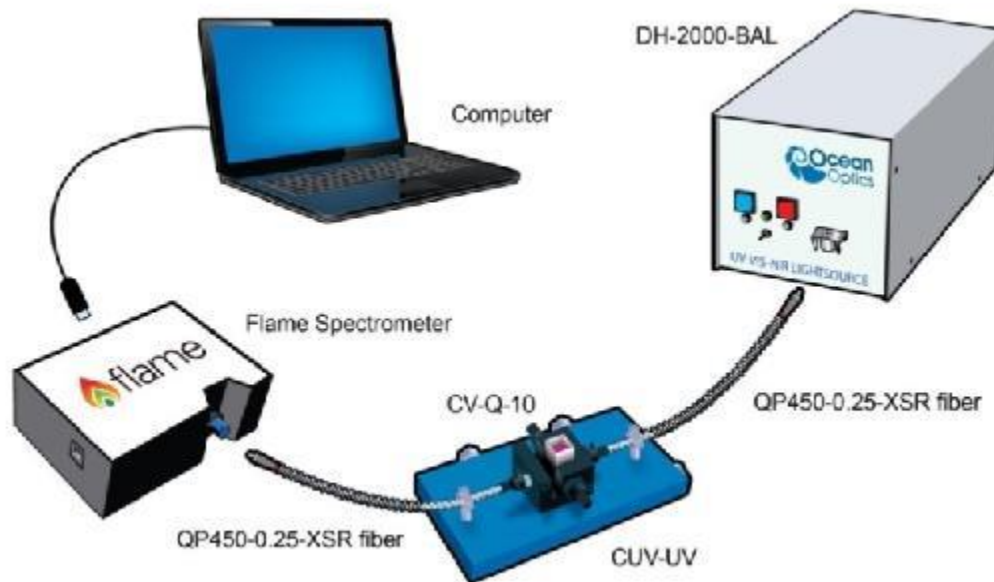


Figura 8. Esquema del espectrómetro Flame-S para medir la absorbancia (52)

A partir de los espectros del análisis por espectroscopia de UV-Vis se puede obtenerse información que resulta de gran utilidad, como:

1. Comprobar que las nanopartículas se sintetizaron.
2. Comparar cantidades de NP obtenidas en las distintas síntesis
3. Tener una idea sobre el tamaño de las NPs sintetizadas.
4. Visualizar a grandes rasgos su distribución de tamaños.

Al conocer la longitud de onda asociada se puede estimar el diámetro de las nanopartículas. Del ancho del pico se puede tener una idea de la distribución de diámetros al comparar diferentes muestras. En caso de ser el pico más estrecho corresponderá con una muestra con menor dispersión en tamaños, es decir, la diferencia en el valor de diámetros es de unos pocos nanómetros. Pero si el pico es ancho puede haber diferencia en los valores de sus diámetros por unas decenas o cientos de nanómetros (53).

- **Microscopio Electrónico de Transmisión por Barrido (STEM)** combina los principios de microscopía electrónica de transmisión y de barrido y puede ser utilizado tanto en el SEM como en el TEM. Este microscopio requiere muestras electrotransparentes (espesores inferiores a los 100 nm) y permite ver su microestructura, así como evaluar su composición química (54).

La técnica de STEM tiene diferentes modos de formación de imagen, en campo claro (bright field, BF) y en campo oscuro (dark field, DF). En el primer caso, la imagen se forma a partir del haz de electrones transmitido, el cual no sufre dispersión, obteniendo la imagen del objeto oscura sobre un fondo brillante. En el segundo, se usan electrones dispersados, consiguiendo la imagen brillante sobre un fondo oscuro. Por otro lado, también se pueden obtener diagramas de difracción de la muestra, lo que aporta información sobre su estructura cristalina (55).

- Preparación de muestra.

- 1) Agitar la muestra para homogeneizar la disolución que contiene AuNPs.
- 2) Tomar una gota de muestra con la pipeta Pasteur y depositarla sobre una rejilla de cobre (Figura 9) (56).
- 3) La gota se deja secar al aire durante 15 minutos antes de introducir la rejilla de cobre en el portamuestras de STEM.

Las imágenes fueron posteriormente analizadas utilizando el software MatLab.

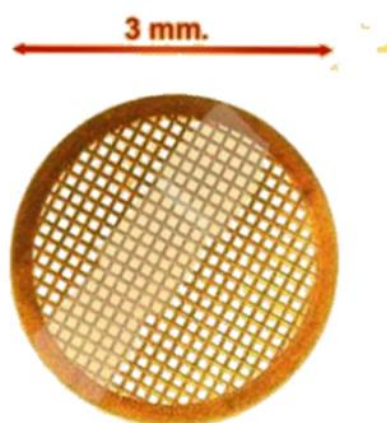


Figura 9. Soporte STEM (56).

- **El EDX o EDS** es una técnica analítica usada para el análisis elemental o la caracterización química. Se basa en el análisis de Rayos-X emitidos por una muestra como consecuencia de ser bombardeada con partículas cargadas (57).

Cuando se dirige un haz de electrones, protones, o Rayos X hacia un átomo, alguno de sus electrones interiores puede ser expulsado de su orbital correspondiente. Los electrones exteriores tenderán a ocupar los huecos producidos y liberarán energía en el proceso; la energía liberada es característica de cada elemento y permite su identificación.

La preparación de las muestras es la misma que en el caso del STEM.

4. Parte experimental

4.1 Síntesis química

Como se ha explicado en apartados anteriores, existen gran variedad de formas de preparación de nanopartículas de oro. Como experimento previo y su posterior comparación, la síntesis de forma sintética (vía húmeda) se ha realizado por el método de Turkevich (34) mediante reacciones de oxidación-reducción partiendo de soluciones acuosas de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) como agente precursor y citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) como agente reductor.

Teóricamente antes de la adición del agente reductor, en la disolución tendremos cationes de oro, Au^{+3} . Cuando añadimos el $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (agente reductor) se forman los átomos de oro metálico y su concentración aumenta rápidamente hasta llegar al punto de saturación de la disolución. A partir de este punto, las partículas se van formando en el proceso conocido como nucleación. De esta forma, los átomos de oro que están presentes en la disolución se unen a los centros de nucleación dando lugar a un crecimiento de las partículas, tal como se explica en la (Figura 10).

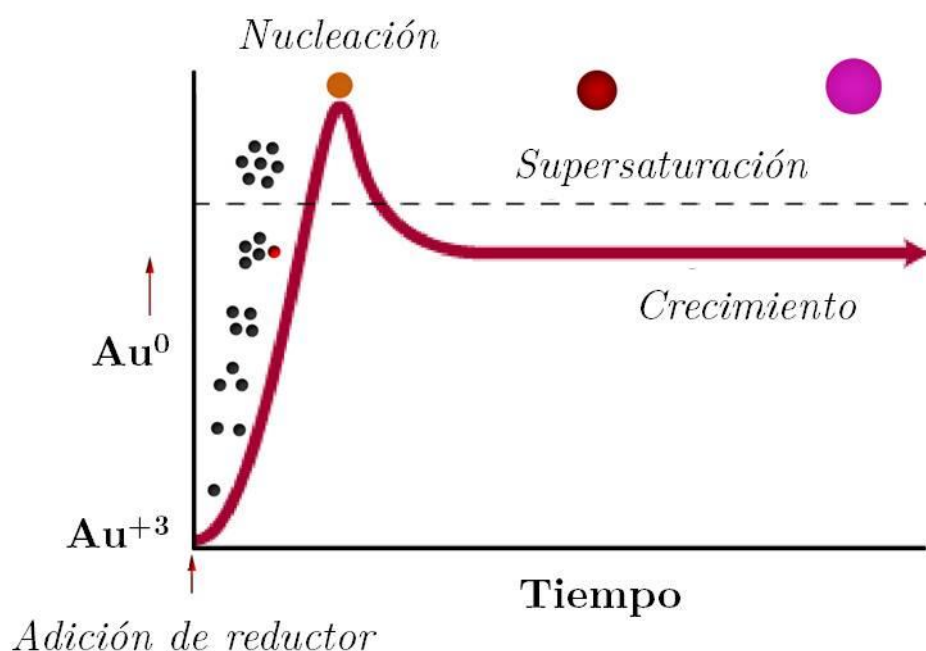


Figura 10. Proceso de crecimiento de las NPs de oro a partir de una disolución de cationes de Au^{+3}

Los métodos químicos de condensación de partículas que permiten la síntesis de AuNP a través del uso de un agente reductor (en este caso a través del empleo de citrato trisódico) estarían definidos en función de la siguiente reacción de síntesis (Figura 11) que se resume como se detalla a continuación:

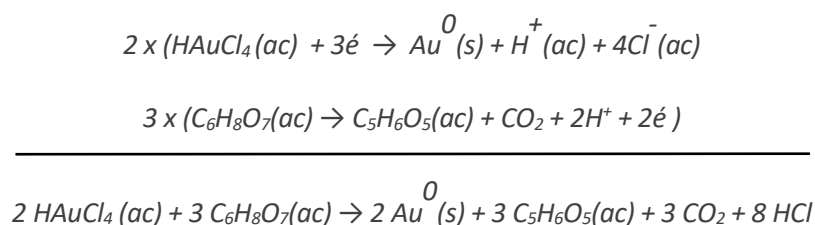


Figura 11. Reacción redox partiendo de ácido tetracloroáurico y ácido cítrico.

4.1.1 Reactivos, material e instrumentación

- Reactivos:

HAuCl₄ de Sigma-Aldrich (grado ACS), Na₃C₆H₅O₇, agua destilada.

- Material e instrumentación utilizados:

Vaso de precipitados de 100 ml (1), balón de destilación con condensador (1), matraz aforado (2), vidrio de reloj (2), espátula (1), balanza analítica (1), embudo (1), soporte con pinzas (1), probeta (1), pipeta de 10 ml (1), pipetas Pasteur (1), placa calefactora (1), agitador magnético (1), botella ámbar (1).

4.1.2 Procedimiento experimental

- Disoluciones de partida: (Figura 12)

Disolución de HAuCl₄ (1,0 mM): Disolver 0.034 g del sólido en 100 mL de agua destilada

Disolución de Na₃C₆H₅O₇ (38,8 mM): Disolver 0.114 g del sólido en 10 mL de agua destilada

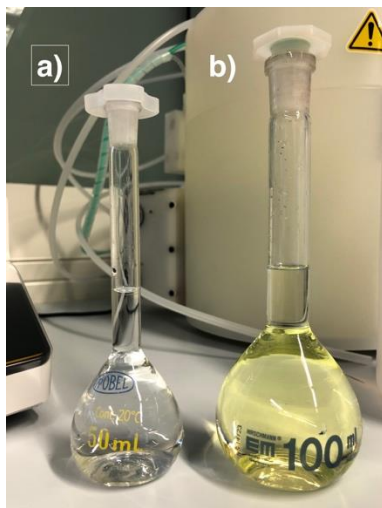


Figura 12. *Disolución de: a) Citrato trisódico y b) Ácido tetracloroáurico*

- **Síntesis de nanopartículas de Au por el método Turkevich**

1) En un balón de destilación de 250 mL equipado con un condensador (Figura 13) se calentó a ebullición con un agitador magnético para la agitación y mezcla continua 100 mL de una disolución de HAuCl_4 acuoso (1,0 mM). Luego se añadieron 10 mL de una disolución de citrato trisódico (38.8 mM) cuando la disolución de HAuCl_4 alcanzó el punto de ebullición bajo continua agitación.



Figura 13. *Un balón de destilación de 250 mL equipado con un condensador*

Como podemos observar (Figura 14), inmediatamente después de la adición de citrato trisódico, la solución cambió de color a amarillo débil. Después de unos 15 s, el color cambió a azul oscuro, y finalmente rojo tinto después de unos 50 s. El cambio de color indica la formación de NPs sintéticas.

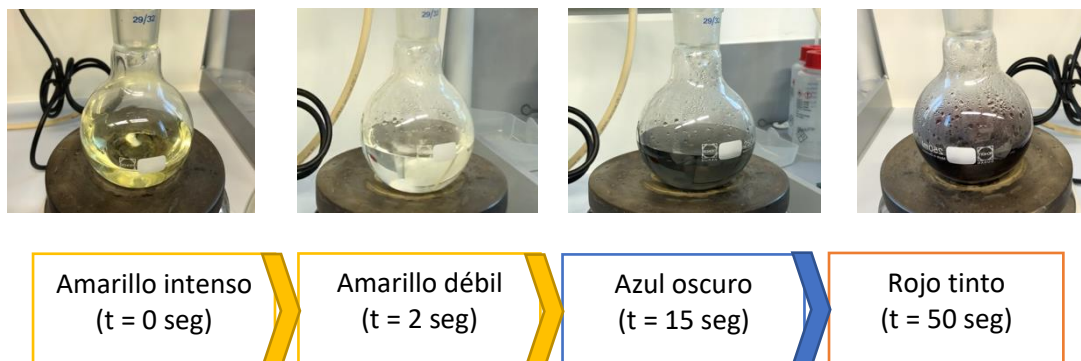


Figura 14. Cambio secuencial de colores durante la síntesis de AuNPs.

Los metales no absorben la luz visible; en cambio, pueden devolver casi toda la luz que les llega gracias a que algunos de sus electrones no están unidos a átomos individuales, sino que están 'libres' para moverse. En el caso del oro, el cambio de color es debido a que no todos los electrones son libres y aquellos que se encuentran ligados a los átomos son los responsables de la tonalidad dorada de este elemento. Al reducir el tamaño de las partículas a escala nanométrica, la luz ya es capaz de penetrar el metal. La pequeña penetración de la luz en los metales es suficiente para que llegue a toda la nanopartícula y todos los electrones empiezan a moverse colectivamente por efecto de esta luz. Se desplazan juntos de un lado a otro de la nanopartícula de forma oscilatoria al 'ritmo' que les marque la onda de la luz. Por esa razón, las nanopartículas de oro, cuanto más pequeñas presentarán un color más rojizo.

2) La mezcla se hirvió agitando durante 15 minutos para dar a cabo la reacción y se agitó durante 10 minutos adicionales para eliminar el calor. Se esperó hasta que la disolución de NPs obtenidas alcanzara la temperatura ambiente para luego almacenarla en una botella ámbar a 5 ° C.

4.2 Discusión de los resultados de la Síntesis Química

4.2.1 Mediante Espectroscopia UV-Vis

Para el montaje del equipo se requiere del siguiente material (Figura 15):

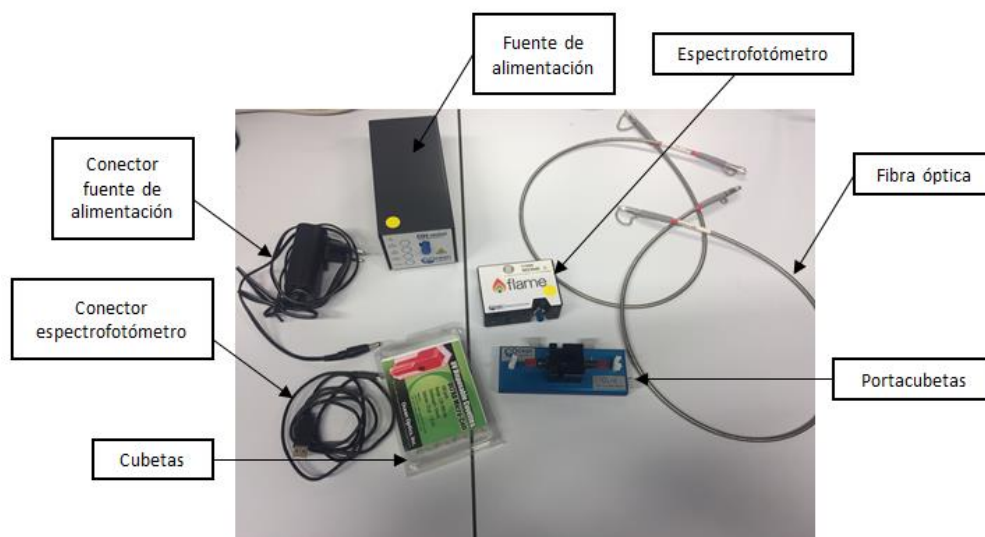


Figura 15. Material UV-Vis Flame S.

- Conectar la fuente de alimentación a la corriente y el espectrofotómetro al ordenador.
- Unir la fibra óptica con la fuente de alimentación y la porta cubetas.
- Repetir el mismo procedimiento uniendo el portacubetas con el espectrofotómetro.

Precauciones a tener en cuenta

- Tome las cubetas por la parte superior evitando dejar restos de grasa o suciedad en la cubeta que podrían afectar a la lectura de la absorbancia.
- Asegúrese que antes de introducir las cubetas en el espectrofotómetro se encuentran perfectamente limpias y secas ya que, de lo contrario, al tratarse de disoluciones que contienen ácido, podrían dañar el equipo. Previo al análisis de las muestras, se coloca en una cubeta de plástico 1 mL del blanco (agua destilada en este caso) para calibrar el equipo.
- Para realizar el análisis de las muestras, se debe tener en cuenta que la absorbancia no sea mayor que dos. Por eso el factor de dilución utilizado de la muestra es $1:2 V/V_{\text{total}}$ para cumplir dicho requisito.

El espectro visible de una solución de oro coloidal aporta información acerca del tamaño y la uniformidad de sus partículas. Para las nanopartículas de Au de 12-13 nm de diámetro, el pico correspondiente al máximo aparece a una longitud de onda de 520 nm. De todas formas, la posición de λ_{\max} puede variar de una muestra a otra en función del tamaño de las nanopartículas, tal como se muestra en la siguiente **Tabla 3**:

Tamaño de partícula / nm	λ_{\max} / nm
< 12	< 520
12	520
> 12	> 520

Tabla 2. Relación entre el tamaño de partícula y la posición del pico de máxima absorción.

Los resultados se muestran en la (Figura 16). Un máximo de absorción entre rangos de 521-522 nm, lo que puede relacionarse con tamaños de 10-15 nm (el resultado de los tamaños se expondrá más adelante), lo que es un indicativo de partículas cercanas a los tamaños esperados en este método. En la (Figura 16) se observa un pico estrecho y la anchura a media altura es de 47,8 nm, lo que sería un indicativo de la obtención de una distribución de tamaños relativamente homogéneos en este caso.

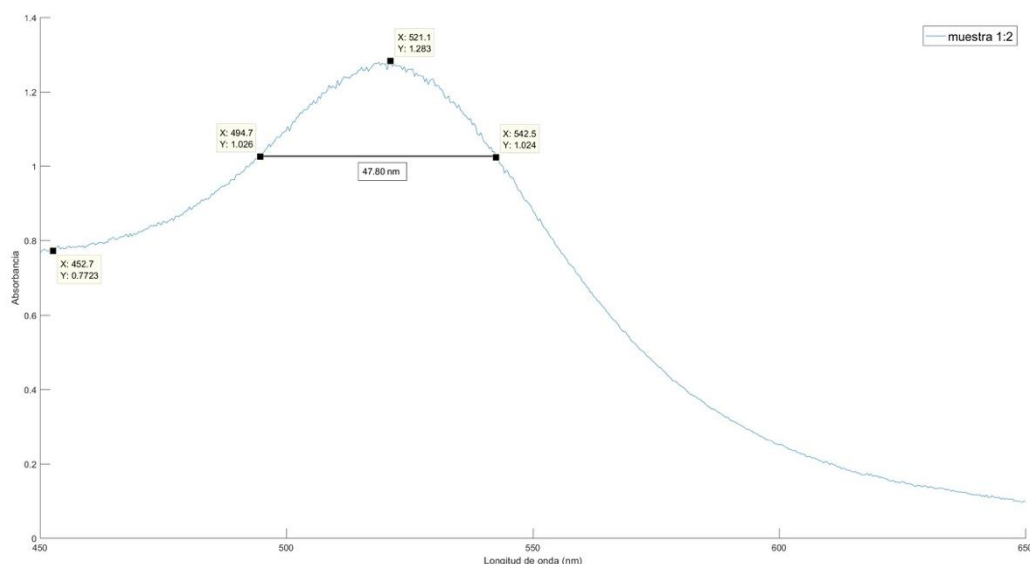


Figura 16. Espectro UV-vis nanopartículas sintéticas.

4.2.2 Mediante Microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM)

Otra técnica analítica utilizada fue la Microscopia electrónica de Transmisión por barrido, en la cual podemos observar la morfología y tamaño de las nanopartículas de oro obtenidas mediante la síntesis química (Figura 17 y 18).

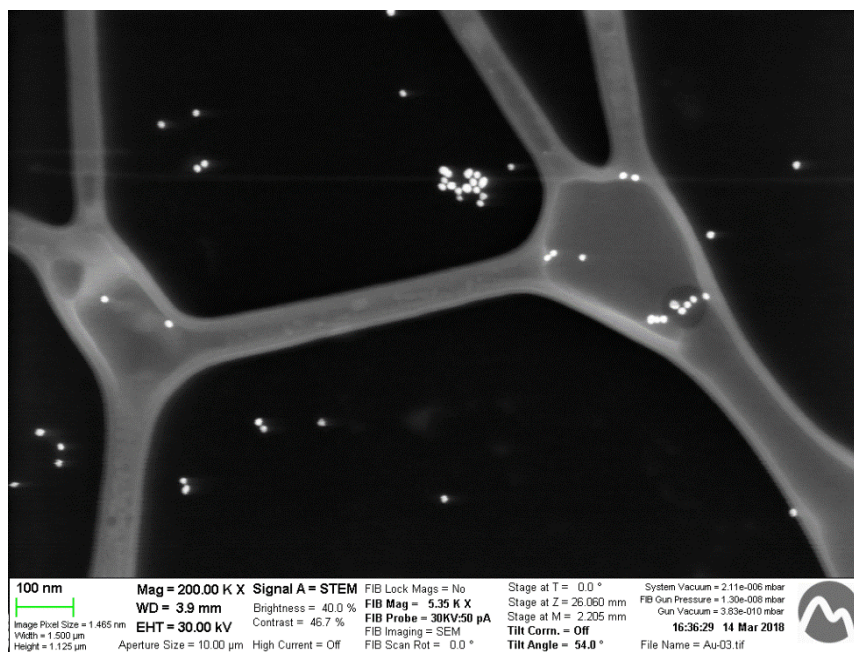


Figura 17. Micrografía STEM de AuNPs sintéticas

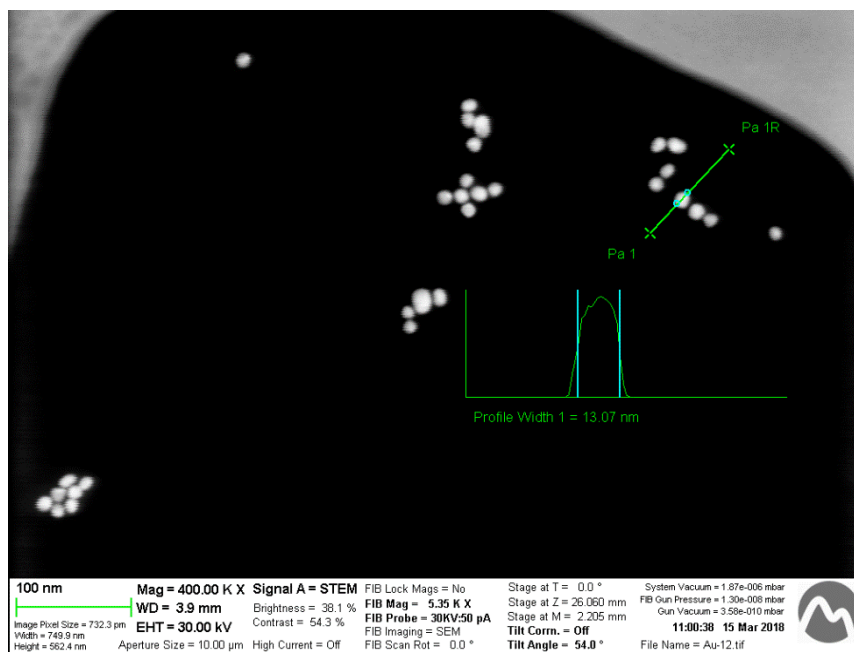


Figura 18. Micrografía STEM de la medida de AuNPs sintéticas

Del espectro UV-Vis (Figura 16) se comprueba que hay presencia de nanopartículas en la muestra al presentar un plasmón de resonancia a los 521,1 nm. Al estar el LSPR cerca de los 520 nm, el diámetro de las nanopartículas debe ser pequeño. La micrografía de STEM (Figura 18) muestra que los diámetros de las nanopartículas son pequeños, corroborando lo interpretado en el espectro UV-vis por la posición del LSPR. Además, pareciera que no existe gran diferencia de los diámetros entre nanopartículas. En efecto, existe una distribución que difiere muy poco en diámetros. Lo anterior se comprueba al analizar el histograma de la (Figura 19).

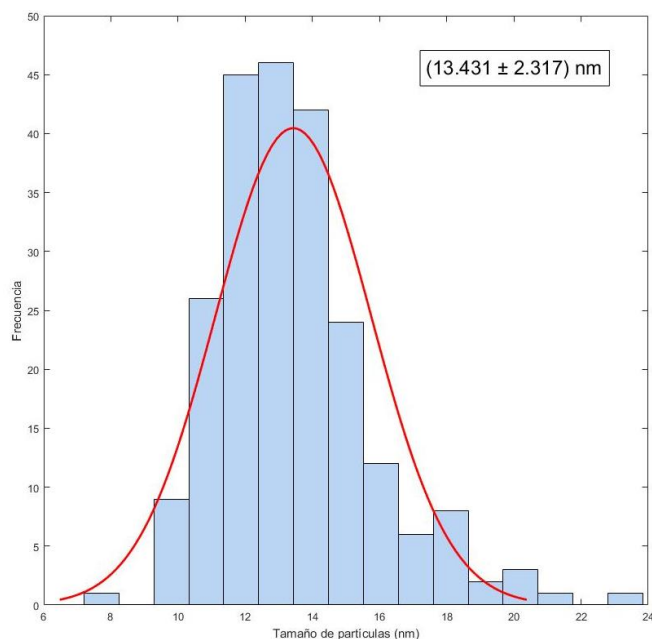


Figura 19. Histograma de AuNPs sintéticas

Analizando diversas imágenes tomadas mediante STEM, podemos confirmar que dichas nanopartículas presentan un diámetro medio de $13,4 \pm 2,3$ nm.

El tamaño de las nanopartículas de todas las micrografías STEM se ha medido utilizando el software ImageJ. La distribución del tamaño ha sido analizada por el software MatLab.

4.3 Síntesis Verde

Teniendo en cuenta que el extracto de raspo de uva contienen compuestos antioxidantes capaces de reducir los iones de oro (Au^{3+}) a oro metálico (Au^0), se han diseñado una serie de experimentos con el fin de comprobar la respuesta de cada uno de ellos ante la síntesis de nanoestructuras. La reacción producida (Figura 20), se muestra a continuación:

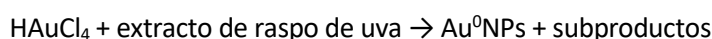


Figura 20. *Reacción de reducción de los iones Au^{3+} en Nps metálicas Au^0*

4.3.1 Reactivos, material e instrumentación

- Reactivos:

Raspo de uva de Subirats (Alt Penedès), HAuCl_4 , de Sigma-Aldrich (grado ACS), agua destilada.

- Material e instrumentación utilizado:

Ultrasonidos Selecta , Tamizadora y tamices Filtra de 1; 0,8; 0,5 y 0,35 milímetros , Condensador, Termómetro, Manta calefactora Fibroman-C, Embudo Büchner y papel de filtro Whatman No.1., Bomba de vacío, Matraz Kitasato, Centrífuga Centronic-bl II, Jeringa de 20 ml Norm-Ject, Filtros de 0,2 μm Agilent, Estufa, Molinillo Waring Commercial, Tubos de ensayo de vidrio de capacidad de 15 mL, Baño de agua termostático Digiterm100, Pipetas electrónicas 1 mL, 5 mL, 10mL, Matraces aforados, Vasos de precipitados, Gradillas, Cronómetro, Parafilm, Matraz Erlenmeyer de 500mL, Espátula de metal, Balanza analítica, Vaselina, Guantes y Tijeras.

4.3.2 Adecuación del raspo de uva

El objetivo de la adecuación del raspo de uva es obtener porciones de raspo lo más homogéneas posible, eliminando impurezas y suciedad. Los pasos a seguir son los siguientes:

- 1) **Separación del raquis y los pedicelos. (Figura 21).** Todas las impurezas deben eliminarse manualmente, por ser residuos de la elaboración del vino, pueden contener hojas y pieles de uva.



Figura 21. Raspo de uva compuesto por: a) El raquis (tallo leñoso que estructura el racimo) y b) Los pedicelos (parte en contacto con los frutos)

- 2) **Lavado con agua destilada** para eliminar impurezas y otros contaminantes. El lavado manual consta de 3 pasos:
- Lavar agitando con agua destilada durante 3 minutos y dejar reposar durante 6 minutos. Cambiar el agua usada.
 - Lavar agitando con agua destilada durante 2 minutos y dejar reposar durante 4 minutos. Cambiar el agua.
 - Lavar agitando con agua destilada durante 1 minuto y dejar reposar durante 2 minutos.
 - Una vez terminado el proceso, dejar secar durante 24 horas a temperatura ambiente en una atmósfera libre de polvo.
- 3) **Lavado de ultrasonidos** durante 5 minutos a máxima potencia para eliminar impurezas incrustadas. Se usó recipientes de vidrio para una mejor transmisión de las ondas mecánicas.



Figura 22. Lavado de ultrasonidos del raspo de uvas

- 4) **Secado en estufa** durante 24 horas a 110 °C. Se cubrió el fondo de la estufa con papel y se repartió el raspo lo más uniformemente posible en la superficie.
- 5) **Triturado** de lotes con una máquina de trituradora (Figura 23) durante 4 minutos evitando que sature.



Figura 23. Triturado del raspo de uva

- 6) **Tamizado** de lotes durante 10 minutos. Se seleccionaron los tamices de 0,8 mm, 0,5 mm y 0,35 mm (58). En este proyecto se utiliza el raspo de un tamaño fijo, comprendido entre 0,8 mm y 0,5 mm (Figura 24). La selección de tamices es de acuerdo con investigaciones previas, este rango de dimensiones de partículas es óptimo porque, por un lado, es lo suficientemente pequeño y, por otro lado, no tan pequeño por si las partículas son demasiado pequeños, obstruirán los poros del papel de filtro, lo que significa falta de eficiencia en el proceso experimental posterior.



Figura 24. Raspo de uva tamizado: a) Mayor de 0,8mm, b) Entre 0,8 y 0,5mm, c) Entre 0,5 y 0,35mm, d) Menor de 0,35mm

4.3.3 Preparación del extracto de raspo de uva

- 1) **Extracción por reflujo:** Se pesan 3 g de raspo de uva tamizado entre 0,8 y 0,5 mm, y se coloca en el matraz esférico para reflujo de 500 ml. Se añadió 100 ml de agua destilada medida con un matraz aforado. Sobre el matraz esférico se coloca el condensador para perder la mínima cantidad de disolvente. El montaje, el cual se muestra en la (Figura 25), se coloca sobre una manta calefactora y se deja en reflujo durante un tiempo de 10 minutos, empezándose a contar a partir del momento de ebullición. Transcurridos los 10 minutos, se apagó la manta calefactora y se esperó 10 minutos adicionales antes de cerrar la corriente de refrigeración, para evitar pérdidas de vapor. En la investigación previa (1) se determinó que 10 minutos fueron suficientes para extraer la cantidad máxima de polifenoles, en base a 3 tiempos de reflujo diferentes: 10, 30 y 60 minutos.

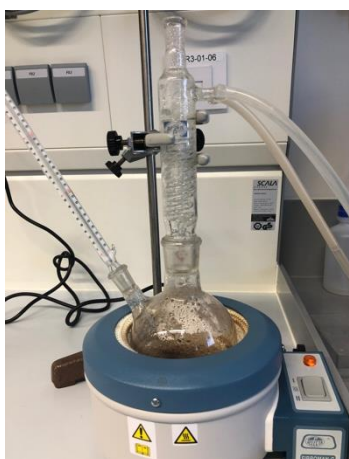


Figura 25. Montaje de la extracción por reflujo

- 2) **Filtrado al vacío:** Después de 10 minutos de espera, el contenido del matraz se filtró en vacío con un matraz Kitasato y un embudo Büchner, usando el papel de filtro Whatman. Vea el montaje experimental en la (Figura 26).

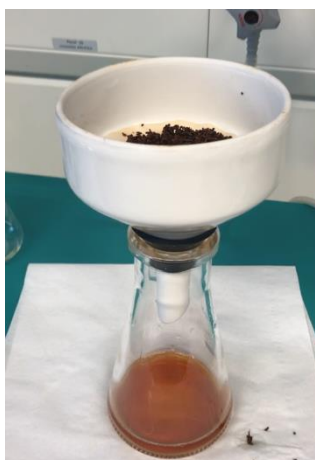


Figura 26. Filtrado al vacío

- 3) Centrifugado (Figura 27):** Se centrifuga el extracto obtenido a 5000 r.p.m. durante 10 minutos para garantizar la mayor eliminación del residuo de raspó, distribuyendo equitativamente la solución en los tubos de ensayo.

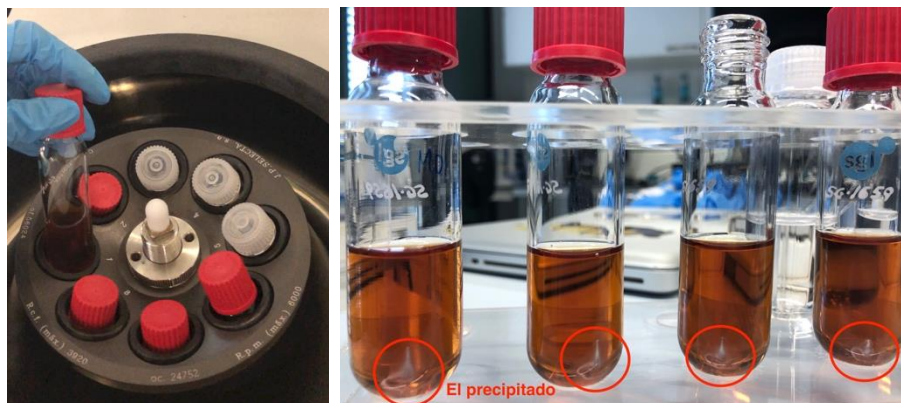


Figura 27. Los tubos de ensayo con el extracto después de centrifugar

- 4) Filtrado usando un filtro de jeringa RC Agilent:** El sobrenadante se separa utilizando una micropipeta de 5 ml sin tocar el precipitado que se ha formado en la parte inferior de los tubos, y se utiliza el filtro de la jeringa para eliminar la parte precipitada. Finalmente, el extracto fue etiquetado y almacenado en la nevera a 4 °C hasta el día siguiente (2).

4.3.4 Preparación de nanopartículas de oro

Toda la parte experimental de la preparación de nanopartículas de oro de la síntesis verde puede separarse en dos grandes secciones: una es la síntesis mediante la adición de disolución de HAuCl_4 a un volumen constante de la disolución del extracto y la otra, síntesis mediante la adición de la disolución del extracto a un volumen constante de la disolución de HAuCl_4 para así determinar la influencia tanto del extracto como de la cantidad de oro en la concentración, morfología y tamaño de las nanopartículas obtenidas.

Los detalles experimentales (variables y cantidades) están resumidos en la **Tabla 3 y 4**.

- El mismo volumen de la disolución del extracto (8 mL) se ha utilizado en todos los experimentos de la **Tabla 3**, cuatro volúmenes diferentes de la disolución de HAuCl_4 (1 mL, 2mL, 4mL y 6 mL) se han empleado para estudiar cómo la cantidad de iones metálicos afectará a la forma de las NPs, y se han agregado diferentes volúmenes de agua destilada para asegurar que todas las muestras tengan la misma concentración de compuestos orgánicos. Las muestras 0 (que contienen la misma cantidad de extracto) se han utilizado como muestra de referencia para calibrar el espectrofotómetro.

- El mismo volumen de la disolución de HAuCl_4 (4 mL) se ha utilizado en todos los experimentos de la **Tabla 4**, cinco volúmenes diferentes de la disolución del extracto (2 mL, 4mL, 6mL, 8mL y 10mL) se han empleado para estudiar cómo la cantidad de extracto afectará a la forma de las NPs, y se han agregado diferentes volúmenes de agua destilada para asegurar que todas las muestras tengan la misma concentración de compuestos orgánicos. En este caso, para cada experimento se han utilizado unas muestras de referencia diferentes (que contienen diferente cantidad de extracto) para calibrar el espectrofotómetro.

Tabla 3. Condiciones experimentales a Volumen constante de la disolución del extracto

Temperaturas (°C)	Tipo Extracto	Muestra	Extracto (mL)	HAuCl_4 1mM (mL)	Agua destilada (mL)
25	Extracto 1	0	8	0	6
		1	8	1	5
		2	8	2	4
		3	8	4	2
		4	8	6	0
50	Extracto 2	0	8	0	6
		1	8	1	5
		2	8	2	4
		3	8	4	2
		4	8	6	0
80	Extracto 3	0	8	0	6
		1	8	1	5
		2	8	2	4
		3	8	4	2
		4	8	6	0

Tabla 4. Condiciones experimentales a Volumen constante de la disolución de HAuCl_4

Temperatura (°C)	Tipo Extracto	Muestra	Extracto (mL)	HAuCl_4 1mM (mL)	Agua destilada (mL)
25	Extracto 3	1	2	4	8
		2	4	4	6
		3	6	4	4
		4	8	4	2
		5	10	4	0

- **Disoluciones de partida:**

Disolución de HAuCl_4 (1,0 mM): Disolver 0.034 g del sólido en 100 mL de agua destilada

- **Procedimiento experimental:**

- 1) Mezclar los volúmenes de reactivos de acuerdo con la **Tabla 3 o Tabla 4** en 5 tubos de ensayo de 25 mL. Se debe considerar que el tiempo de reacción ha comenzado a contar cuando se mezclaron los reactivos. Por lo tanto, primero se recomienda añadir la disolución del extracto en los tubos de ensayo, luego el agua destilada y finalmente la disolución de oro.
- 2) Tapar los tubos de ensayo y agitarlos para homogeneizar las disoluciones.
- 3) Sumergir los tubos en un baño de agua termostático con agua precalentada a una temperatura de 50 °C o 80 ° C durante 2 horas. Luego sacar las muestras y enfriarlas con agua del grifo. En caso de la temperatura ambiente (25°C), los tubos se dejan reposados en una gradilla durante 2 horas.
- 4) Centrifugar las muestras a una velocidad de 6000 rpm durante 20 min para eliminar las nanopartículas más grandes de 100 nm
- 5) Filtrar el sobrenadante usando una micropipeta de 5 mL sin tocar el precipitado, y mediante una jeringa con un filtro de 0,2 μm eliminar la parte precipitada.
- 6) Finalmente, guardar las muestras en la nevera a 4 °C durante 24 h para posteriores análisis (2).

En la (Figura 28) podemos observar como influye la temperatura en el color de las muestras después de dar la reacción en un baño termostático a temperatura 50°C.

El color de las muestras reaccionadas a temperatura ambiente se conserva. En cambio, las muestras de la (Figura 28a) a temperatura ambiente se ven más oscuras que las muestras de la (Figura 28b) sacadas del baño termostático a temperaturas superiores. No es sorprendente que las muestras 1 y 2 sean más claritas que las muestras 3 y 4 ya que llevan el mayor contenido de cationes metálicos.

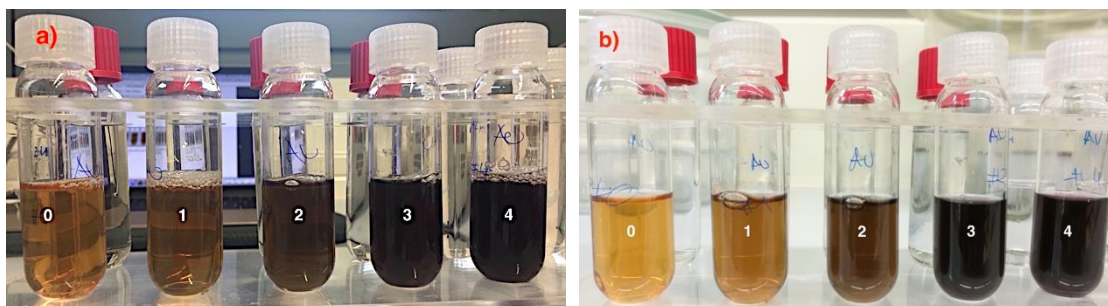


Figura 28. El color de las muestras: a) Antes de dar la reacción a $T=50^{\circ}\text{C}$,
b) Después de dar la reacción a $T=50^{\circ}\text{C}$

Además, los colores de las muestras después de la centrifugadora son más ligeros que antes ya que las NPs de más de 100 nm se han separado y se ha formado el precipitado en el fondo de los tubos de ensayo, como es evidente en la (Figura 29).

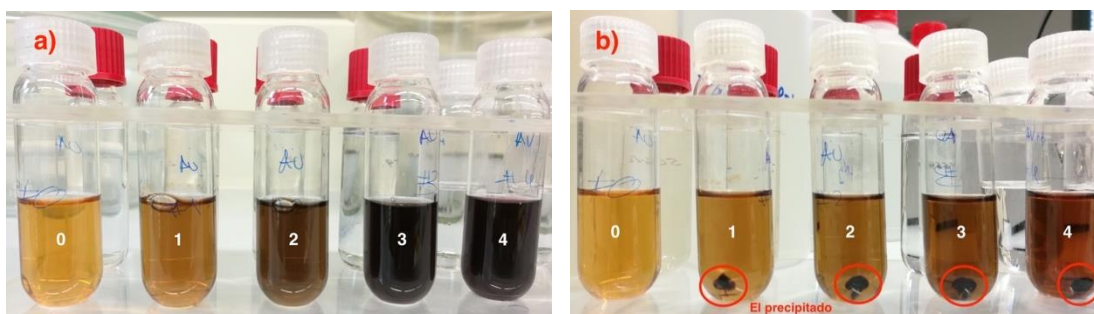


Figura 29. El color de las muestras después de dar la reacción a $T=50^{\circ}\text{C}$:
a) Antes de centrifugar, b) Después de centrifugar

4.4 Discusión de los resultados de la Síntesis Verde

4.4.1 Síntesis a un volumen constante de la disolución del extracto a Tamb.

4.4.1.1 Mediante Espectroscopia UV-Vis

Concluida la síntesis, previo al análisis de las muestras, se colocó en una cubeta de plástico 1 mL del blanco (muestra 0) para calibrar el equipo. Finalmente, las muestras obtenidas mediante la síntesis verde a un volumen constante del extracto y temperatura ambiente se han caracterizado con espectroscopia UV-Visible y muestran los espectros correspondientes en la siguiente (Figura 30 y 31):

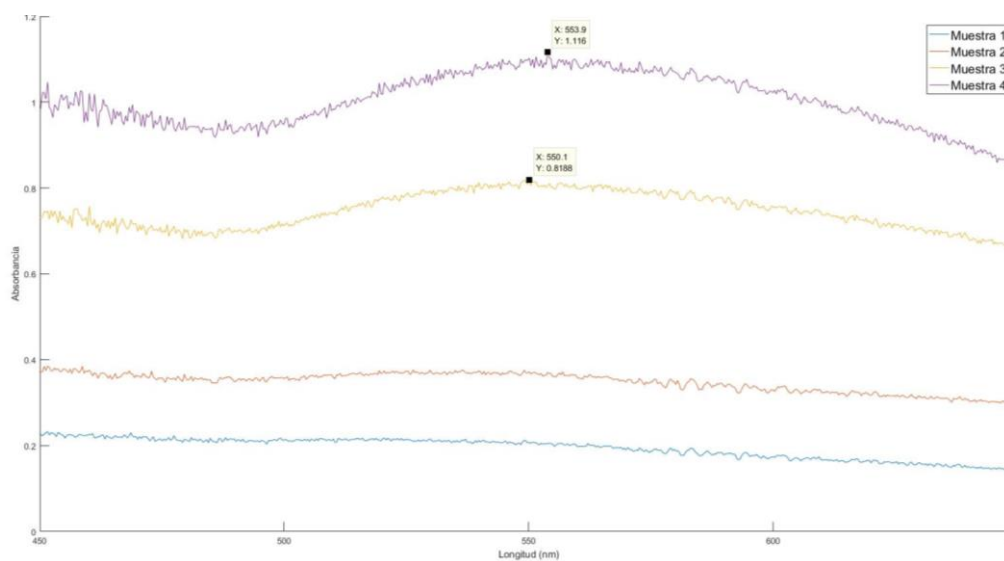


Figura 30. Espectros UV-vis de las muestras sin diluir

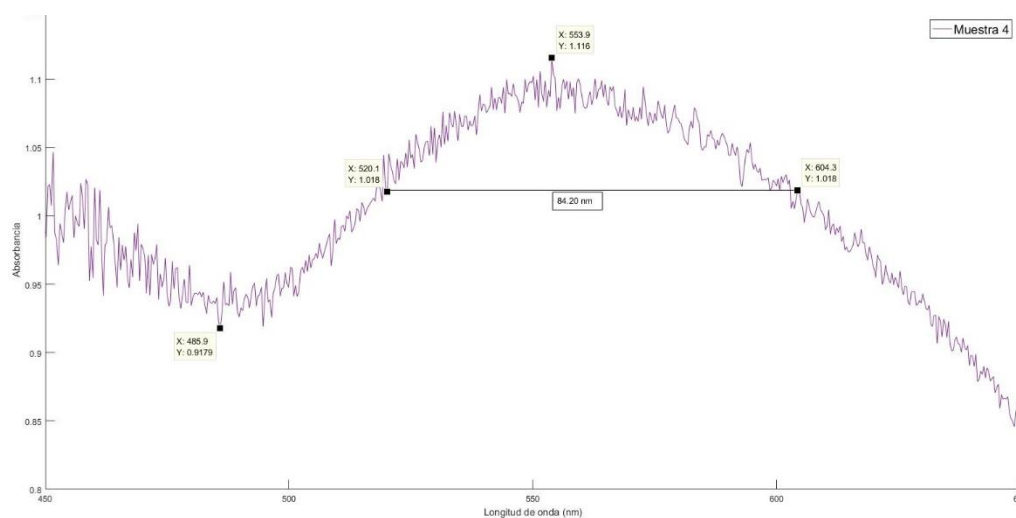


Figura 31. Espectros UV-vis de la muestra 4 sin diluir

Puede observarse en la (Figura 30) como algunas muestras no mostraron un pico asociado a la resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR). En particular este caso sucede con la muestra 1 y 2 que fueron las que contenían menor concentración de la disolución de HAuCl_4 . De ello puede pensarse que a tales condiciones no hay suficiente presencia de los compuestos capaces lograr la síntesis de nanopartículas. Según las muestras 3 y 4, el pico sufre un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda al aumentar la proporción de la disolución de HAuCl_4 en la mezcla, y por tanto se produce un aumento en el tamaño de las nanopartículas. Además, los resultados muestran que el aumento de la cantidad de cationes de oro disponibles está ligado al incremento de la absorbancia (3).

En la (Figura 31) se aprecia claramente que el ancho del pico a media altura de la muestra 4 es amplio (84,2 nm) comparado con el de la síntesis química (47,8 nm), indicador de que la dispersión en tamaños de las nanopartículas sintetizadas es más amplia.

También se puede observar el efecto que ejerce el tiempo en la síntesis de las nanopartículas de oro (Figura 32 y 33), ya que la intensidad de la absorción en los espectros de UV-vis aumenta, por lo que podemos deducir que se produce un aumento en la concentración de nanopartículas de la disolución coloidal y se produce un desplazamiento del plasmón hacia longitudes de onda más pequeñas, con lo cual se puede inferir una reducción en el tamaño de partícula obtenido. No obstante, esta ligera variación con el tiempo puede deberse a variaciones en la calibración del equipo y en este caso, el extracto de raspo de uva, además de ser un efectivo agente reductor, también es un buen agente estabilizante en el proceso de síntesis. Es decir, el hecho de no aumentar en absorción ni modificación alguna en la forma de la curva, nos indica que la reacción ha llegado a un punto de convergencia y no serán sintetizadas más nanopartículas. Lo que implica una estabilidad extracto-precursor y nanopartícula-nanopartícula.

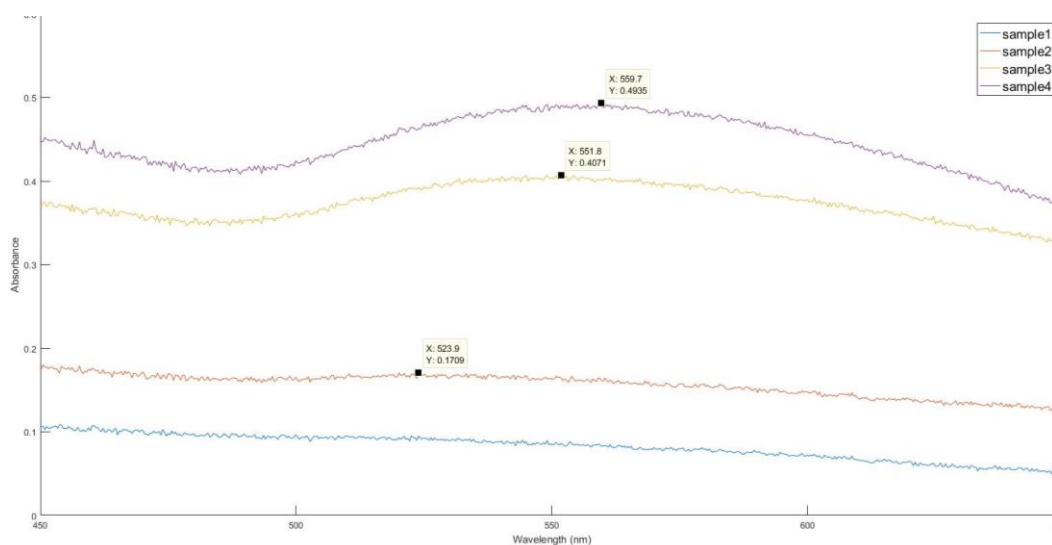


Figura 32. Espectros UV-vis de las muestras diluidas 1:2 V/V a $t=0$

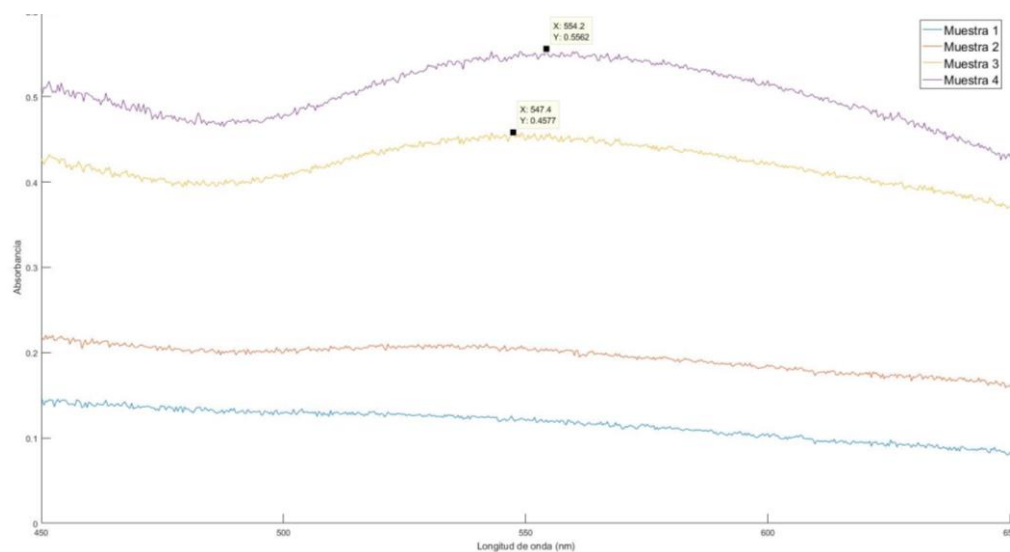


Figura 33. Espectros UV-vis de las muestras diluidas 1:2 V/V a $t=10$ días

Las muestras sintetizadas se resumen más claramente en la **Tabla 5**:

Tabla 5. Resumen de la máxima absorbancia con su correspondiente longitud de onda

T (°C)	Tipo Extracto	Muestra	Diluida 1:2 V/V t=0		Diluida 1:2 V/V t=10 días		Sin diluir	
			λ (nm)	Absorbancia	λ (nm)	Absorbancia	λ (nm)	Absorbancia
25	Extracto 1	3	551,8	0,4071	547,4	0,4577	550,1	0,8188
		4	559,7	0,4935	554,2	0,5562	553,9	1,1160

4.4.1.2 Efecto del pH y el potencial de reducción

El efecto del pH es un factor sumamente importante igual que el E° redox, cuyos valores se muestran en la **Tabla 6**:

Tabla 6. *Tendencia del pH y E° redox en las muestras*

Temperatura ambiente		
Muestra	pH	E° redox (mV)
0	4,40	292,0
1	4,22	296,3
2	4,18	299,9
3	4,15	303,7
4	4,12	305,5
Extracto 1	4,40	272,1
HAuCl₄	2,80	895,3

Los valores de pH muestran una tendencia decreciente a medida que aumenta la concentración de HAuCl₄ en la disolución. Como que el pH de la disolución del ácido es más pequeño que del extracto, a más concentración de HAuCl₄, se acerca cada vez más al pH de la disolución del ácido. El valor de pH de la muestra 0 (el blanco) coincide con el valor del pH del extracto, aunque esté diluido con agua destilada.

Entre el potencial de reducción de ambos reactivos (Extracto 1 y HAuCl₄), hay una diferencia significativa, lo que nos asegura que tenga lugar la reacción redox. El potencial de reducción de las muestras presenta una tendencia creciente a medida que aumenta la concentración de HAuCl₄ en la disolución. Se acerca cada vez más al potencial de reducción de la disolución del ácido.

4.4.2 Mediante Microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM)

La (Figura 34 y 35) muestran micrografías representativas de las nanopartículas de oro obtenidas de la muestra 4 mediante la síntesis verde a un volumen constante del extracto y temperatura ambiente:

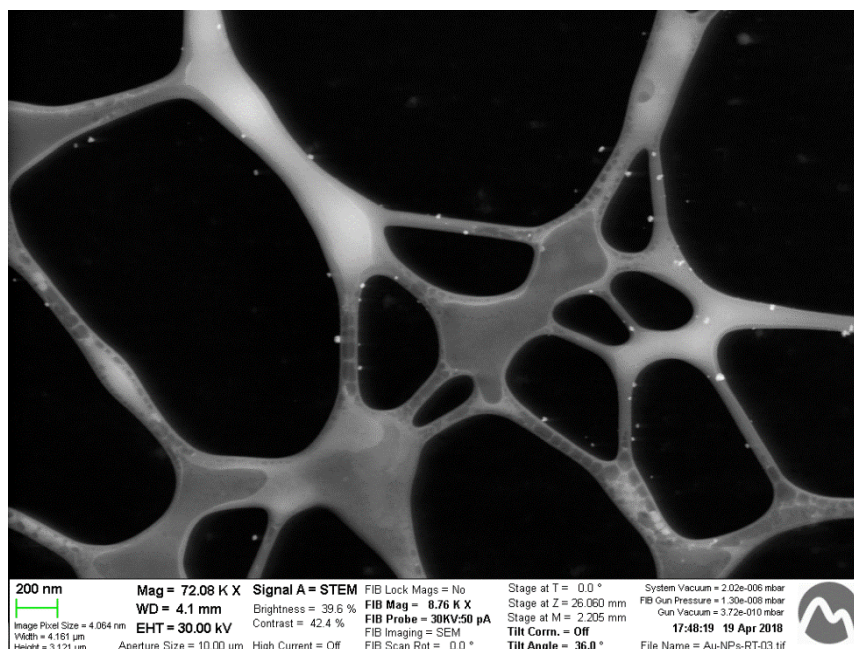


Figura 34. Micrografía STEM de la muestra 4 de AuNPs a Tamb.

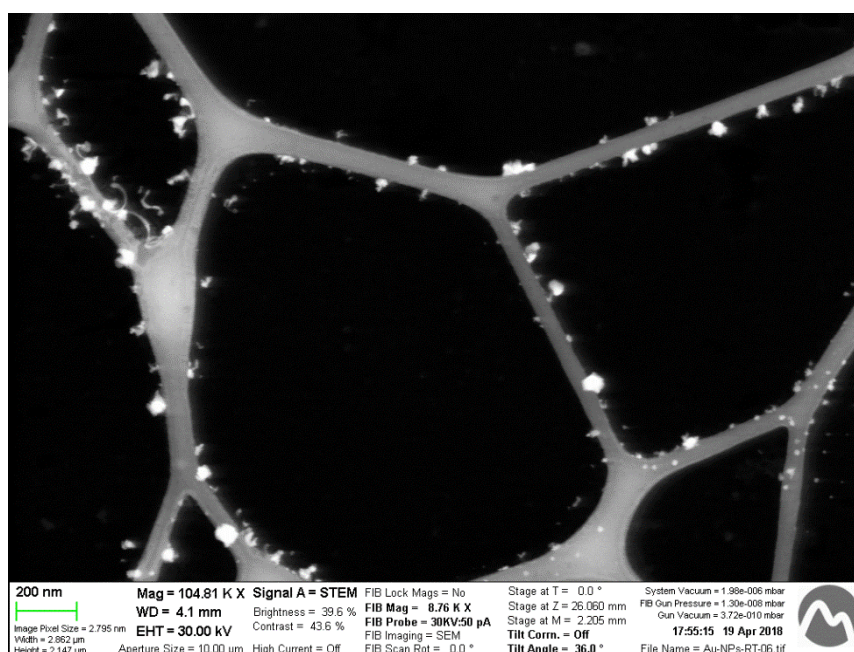


Figura 35. Micrografía STEM de la muestra 4 de AuNPs a Tamb.

Del espectro UV-Vis (Figura 31) se comprueba que hay presencia de nanopartículas en la muestra al presentar un plasmón de resonancia a los 553,9 nm. En función a lo analizado con la muestra sintética se esperaba que las micrografías de STEM en la muestra 4 mostraran nanopartículas de mayor tamaño, como se estima por la localización de su LSPR en el espectro. Además, parece que existe gran diferencia de los diámetros entre nanopartículas de la muestra 4 ya que el pico de la máxima absorbancia muestra mayor anchura. En efecto, existe una distribución que difiere bastante en diámetros. Lo anterior se comprueba al analizar el histograma de la (Figura 36).

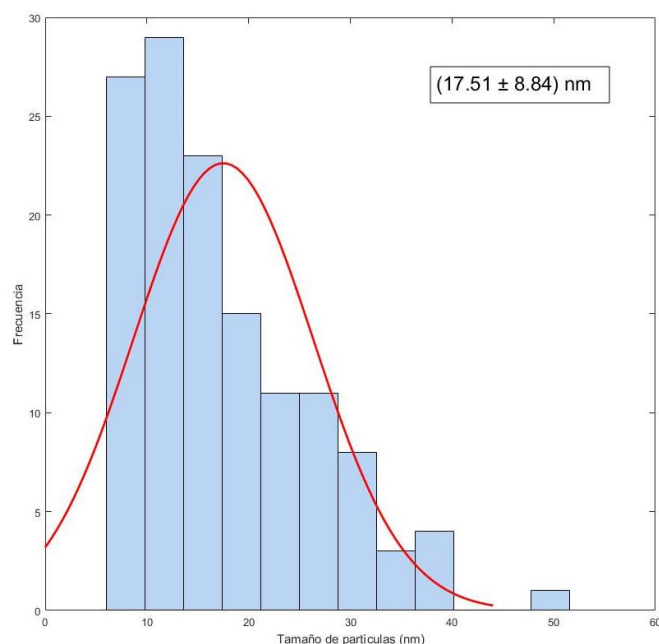


Figura 36. Histograma de la muestra 4 de AuNPs a Tamb.

Analizando diversas imágenes tomadas mediante STEM, podemos confirmar que dichas nanopartículas presentan un diámetro medio de $17,5 \pm 8,8$ nm. Su desviación estándar difiere significativamente de la muestra sintética, puesto que una desviación estándar grande, significa una distribución más amplia.

4.4.2 Síntesis a un volumen constante del extracto a T50°C y T80°C

4.4.2.1 Mediante Espectroscopia UV-Vis

Para analizar las muestras hay que calibrar el equipo con 1 mL del blanco (muestra 0) en una cubeta de plástico. Las nanopartículas de oro obtenidas mediante la síntesis verde a un volumen constante del extracto a T50°C (Figura 37) y a T80°C (Figura 38) se caracterizaron por medio de Espectroscopia UV-Vis:

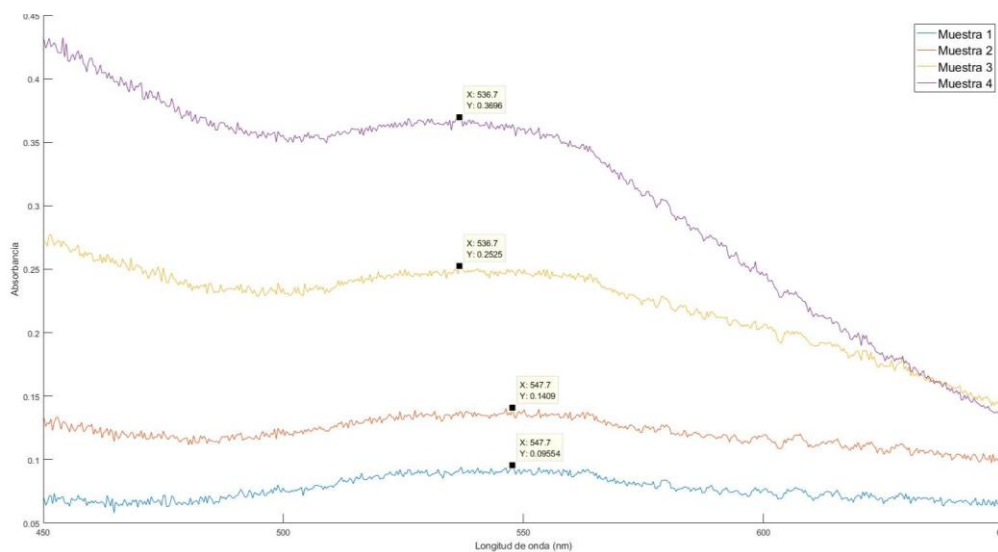


Figura 37. Espectros UV-vis de las muestras a T50°C sin diluir

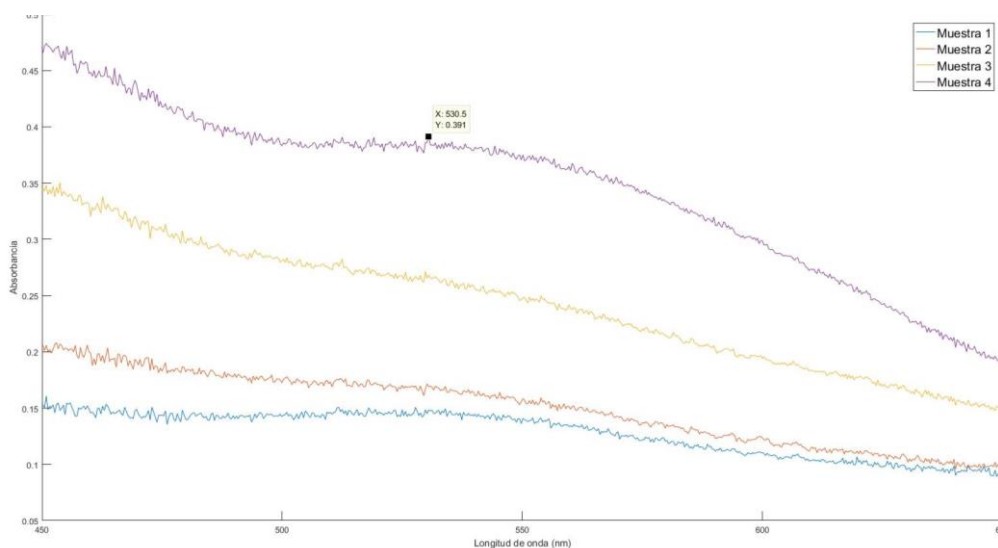


Figura 38. Espectros UV-vis de las muestras a T80°C sin diluir.

Para realizar el análisis de las muestras, el factor de dilución utilizado es 1:1 V/Vtotal, se debe a que la absorbancia no es mayor que dos.

La absorbancia máxima de todas las muestras en la (Figura 37) se encuentra dentro del rango de aproximadamente, 500-600 nm, descrito para AuNPs esféricas (59), y por lo tanto, se verifica la existencia de coloides. En la misma (Figura 37), se observa que al aumentar el volumen del HAuCl₄ en la disolución, se produce un desplazamiento del plasmón hacia longitudes de onda más pequeñas, con lo cual se puede inferir una reducción en el tamaño de partícula obtenido en las muestras 3 y 4. El aumento de la cantidad de cationes de oro disponibles está ligada al incremento de la absorbancia, por lo que podemos deducir que se produce un aumento en la concentración de nanopartículas de la solución coloidal. El ancho de los picos es amplio, lo que significa mayor distribución de tamaños, es decir, a lo largo de la síntesis se han obtenido nanopartículas de muchos tamaños diferentes.

Puede observarse en la (Figura 38) como muestras 1, 2 y 3 no mostraron un pico asociado a la resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR) ya que fueron las que contenían menor concentración de la disolución de oro. De ello puede pensarse que a tales condiciones no hay suficiente presencia de la cantidad inicial de HAuCl₄ y lograrse así la síntesis de nanopartículas.

Las muestras que se han sintetizado a mayor temperatura (T80°C) tienen una mayor absorbancia, pero este corrimiento a longitudes de onda menor, indican que el proceso de nucleación se incrementa y el crecimiento disminuye, lo que implica un menor tamaño de la nanopartícula a (T80°C). En la **Tabla 7** se puede observar más claramente:

Tabla 7. Resumen de la máxima absorbancia con su correspondiente longitud de onda

Tipo Extracto	Muestra	T= 50 °C		T= 80 °C	
		λ(nm)	Absorbancia	λ(nm)	Absorbancia
Extracto 2	1	547,7	0,0955	-	-
	2	547,7	0,1409	-	-
	3	536,7	0,2525	-	-
	4	536,7	0,3696	530,5	0,3910

4.4.2.2 Efecto del pH y el potencial de reducción

El efecto del pH es un factor sumamente importante igual que el $E^{\circ}\text{redox}$, cuyos valores se muestran en la **Tabla 8**:

Tabla 8. *Tendencia del pH y el $E^{\circ}\text{redox}$ en las muestras*

Muestra	Influencia del pH		Influencia del $E^{\circ}\text{redox}$ (mV)	
	T=50°C	T=80°C	T=50°C	T=80°C
0	4,26	4,06	292,3	293,1
1	4,10	4,02	296,5	295,3
2	4,02	3,99	301,1	296,3
3	3,99	3,89	303,9	297,4
4	3,96	3,78	305,7	299,9
Extracto 2	4,3		321,2	
HAuCl₄	2,80		895,3	

Los valores de pH muestran una tendencia decreciente a medida que aumenta la concentración de HAuCl_4 en la disolución. Como que el pH de la disolución del ácido es más pequeño que del extracto, a más concentración de HAuCl_4 , se acerca cada vez más al pH de la disolución del ácido. También se observó que el pH de las muestras a 50°C disminuye más a bajas concentraciones de HAuCl_4 que a unas concentraciones altas. Por lo contrario, el pH de las muestras a 80°C disminuyen menos a bajas concentraciones del ácido y a medida que aumenta la concentración, su disminución crece. En general, según la **Tabla 8**, el incremento de la temperatura provoca la disminución del valor de pH de las muestras.

Entre el potencial de reducción de ambos reactivos (Extracto 1 y HAuCl_4), hay una diferencia significativa, lo que nos asegura que tenga lugar la reacción redox. El potencial de reducción de las muestras presenta una tendencia creciente a medida que aumenta la concentración de HAuCl_4 en la disolución. Se acerca cada vez más al potencial de reducción de la disolución del ácido. El aumento de temperatura hace que la tendencia creciente del potencial de reducción disminuye.

4.4.2.3 Mediante Microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM)

Las imágenes obtenidas mediante STEM fueron utilizadas para estudiar la distribución de tamaño y las formas de las nanopartículas de oro de las muestras 4 mediante la síntesis verde a un volumen constante del extracto a T50°C (Figura 39) y a T80°C (Figura 40):

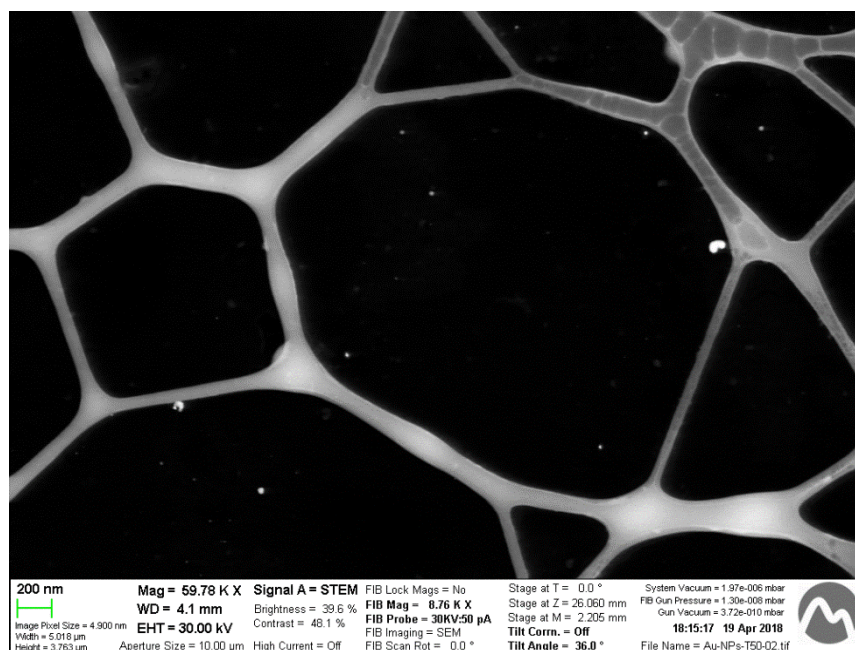


Figura 39. Micrografía STEM de la muestra 4 de AuNPs a T50°C.

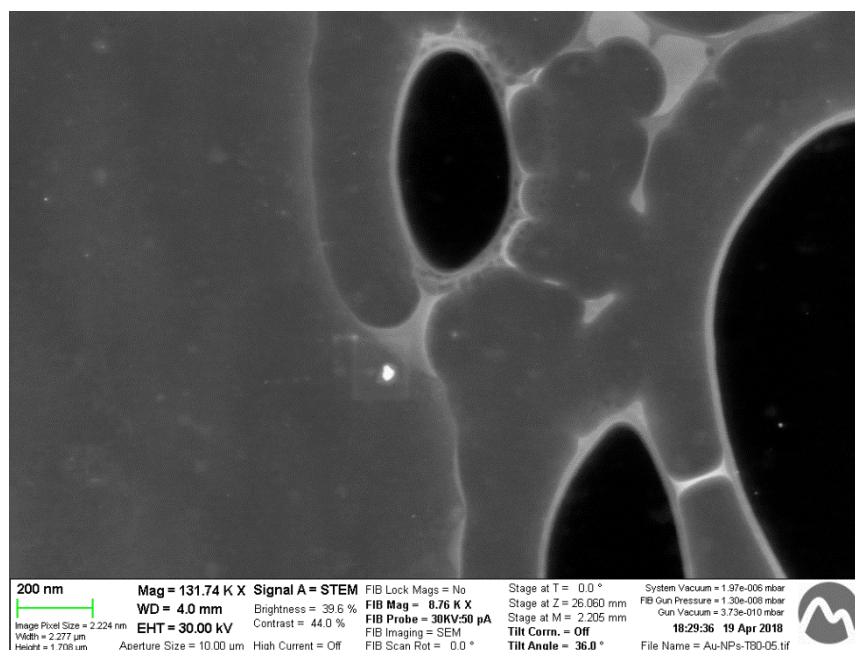


Figura 40. Micrografía STEM de la muestra 4 de AuNPs a T80°C.

De los espectros UV-Vis (Figura 37) y (Figura 38) se comprueba que hay presencia de nanopartículas en la muestra 4 al presentar un plasmón de resonancia a los 536,7 nm a T50°C y a los 530,5 nm a T80°C. En función a lo analizado en los espectros UV-vis se esperaría que las micrografías de STEM en la muestra 4 a T50°C mostraran nanopartículas de mayor tamaño, como se estima por la localización de su LSPR en el espectro. Mientras que a T80°C se esperarían nanopartículas de un menor diámetro.

Además, parece que existe gran diferencia de los diámetros entre nanopartículas de las muestras 4, ya que el pico de la máxima absorbancia muestra mayor anchura. En efecto, existe una distribución que difiere bastante en diámetros, lo que implica una desviación estándar más grande. Lo anterior se comprueba al analizar el histograma de la (Figura 41).

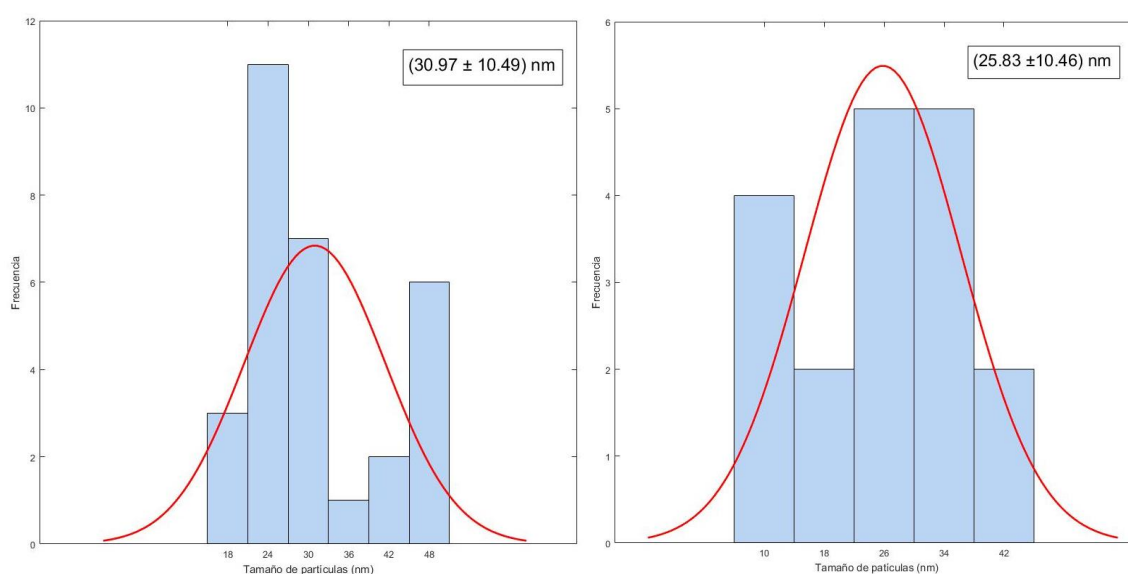


Figura 41. Histograma de la muestra 4 de AuNPs: a) a T50°C, b) a T80°C

Analizando diversas imágenes tomadas mediante STEM, podemos confirmar que dichas nanopartículas presentan un diámetro medio de $31,0 \pm 10,5$ nm a T50°C y de $25,8 \pm 10,5$ nm a T80°C.

4.4.3 Síntesis a un volumen constante del extracto a Tamb., T50°C y T80°C

4.4.3.1 Mediante Espectroscopia UV-Vis

Después de realizar la síntesis de acuerdo a la metodología experimental planteada, se llevaron a cabo análisis de las disoluciones de las nanopartículas de oro obtenidas mediante la síntesis verde a un volumen constante del extracto a Tamb (Figura 42), a T50°C (Figura 43) y a T80°C (Figura 44) por espectroscopia UV-Vis:

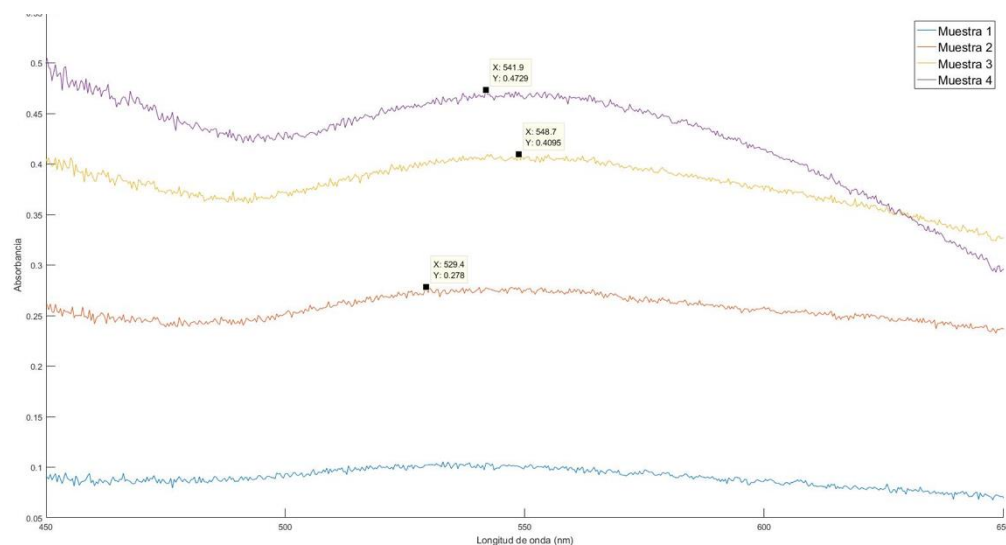


Figura 42. Espectros UV-vis de las muestras a Tamb. sin diluir

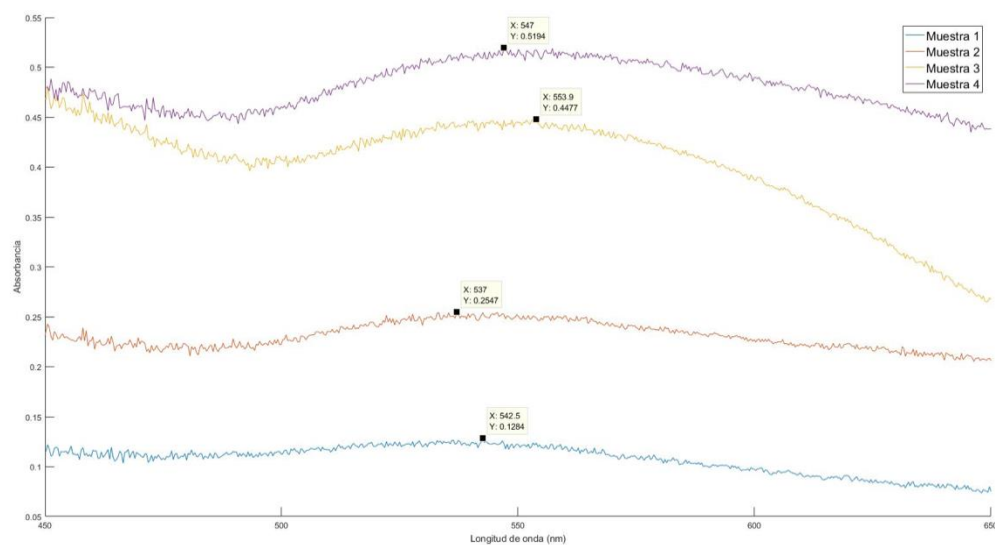


Figura 43. Espectros UV-vis de las muestras a T50°C sin diluir

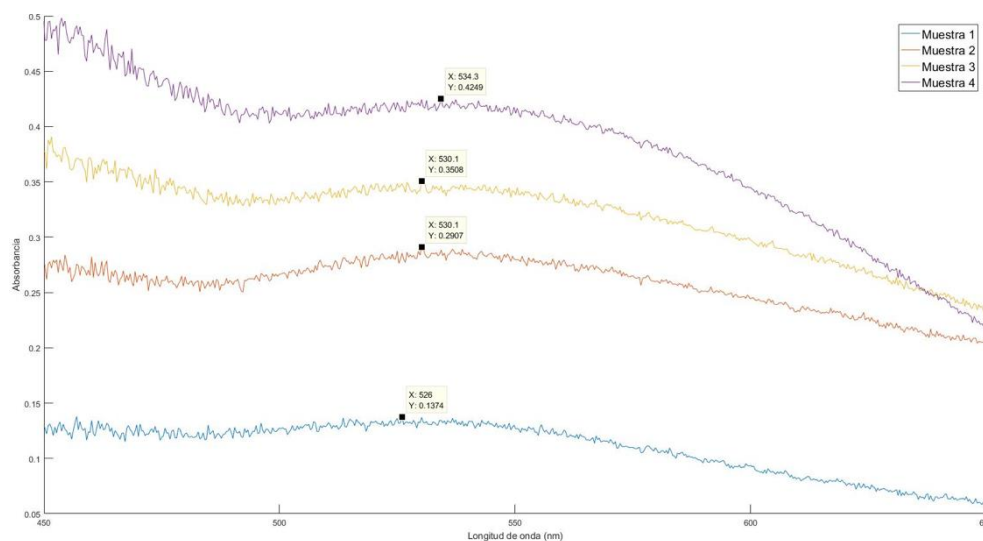


Figura 44. Espectros UV-vis de las muestras a T80°C sin diluir

Antes de analizar las muestras, hay que calibrar el equipo con 1 mL del blanco (muestra 0) en una cubeta de plástico. El factor de dilución utilizado es 1:1 V/Vtotal, se debe a que la absorbancia no es mayor que dos.

La absorbancia máxima en todas las figuras se encuentra dentro del rango de aproximadamente 500-600 nm, lo cual confirma la presencia de las nanopartículas de oro.

Además se observa que, aumentando la cantidad de cationes de oro disponibles, se incrementa la absorbancia de las muestras, por lo que podemos deducir que se produce un aumento en la concentración de nanopartículas de la disolución. El ancho de los picos es amplio, lo que significa mayor distribución de tamaños se habrá obtenido, es decir, los tamaños de las nanopartículas sintetizadas serán menos homogéneos.

Según las muestras 3 y 4 de la (Figura 42) y (Figura 43), el pico sufre un desplazamiento hacia longitudes de onda más pequeñas al aumentar la proporción de la disolución de HAuCl_4 en la mezcla, con lo cual se puede inferir una reducción en el tamaño de partícula obtenido. En el caso de la (Figura 44), ocurre lo contrario, el pico sufre un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda al aumentar la proporción de ácido en la mezcla, y por tanto se produce un aumento en el tamaño de las nanopartículas. No obstante, observando las longitudes de onda de la **Tabla 9**, se puede afirmar que el tamaño de las nanopartículas sintetizadas a T80°C es menor comparado con el tamaño de las obtenidas a temperatura ambiente y a T50°C (Figura 45). Eso es debido a que el tamaño de partícula está relacionado con la posición del pico y presenta unas longitudes de onda más pequeñas. Por otra parte, las longitudes de onda correspondientes a las muestras sintetizadas a T50°C presentan valores más grandes que las de muestras obtenidas a temperatura ambiente, lo que sería un indicativo de un

tamaño mayor de nanopartícula. Por lo tanto, podemos concluir que, en aumentar la temperatura hasta los 50°C, existe una tendencia creciente del tamaño de nanopartícula, lo que no pasa a temperatura 80°C. Es decir, altas temperaturas implican un menor tamaño. Este corrimiento a longitudes de onda menor, indican que el proceso de nucleación se incrementa y el crecimiento disminuye.

Tabla 9. Resumen de la máxima absorbancia con su correspondiente longitud de onda

Tipo Extracto	Muestra	Tamb= 25°C		T= 50 °C		T= 80 °C	
		λ (nm)	Absorbancia	λ (nm)	Absorbancia	λ (nm)	Absorbancia
Extracto 3	1	-	-	542,5	0,1284	528,0	0,1374
	2	529,4	0,2780	537,0	0,2547	530,1	0,2907
	3	548,7	0,4095	553,9	0,4477	530,1	0,3508
	4	541,9	0,4729	547,0	0,5194	534,3	0,4249

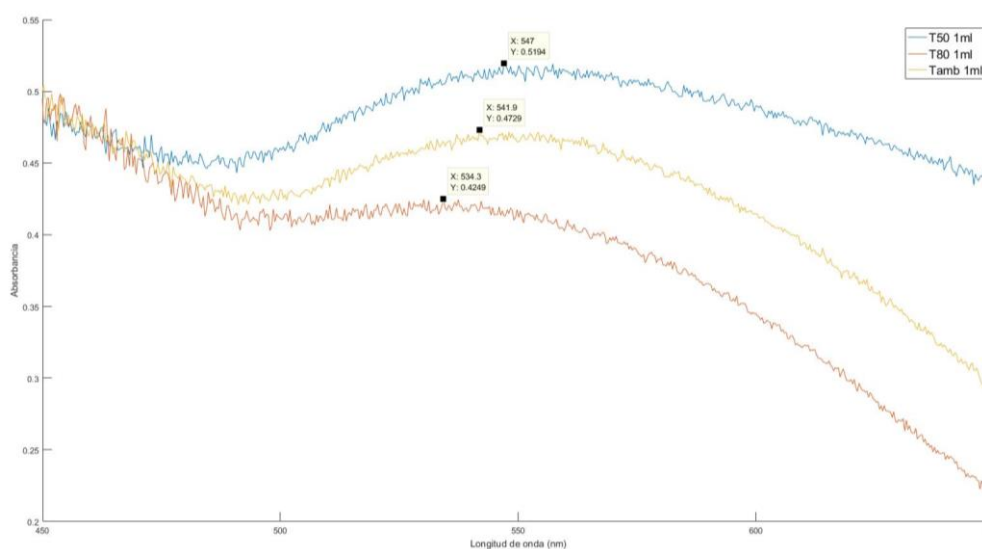


Figura 45. Espectros UV-vis de las muestras 4 a diferentes temperaturas de síntesis.

En la (Figura 45), se observa la máxima absorbancia a T50°C, indicador de que se produce una mayor concentración de nanopartículas de la disolución.

4.4.3.2 Efecto del pH y el potencial de reducción

El pH es un parámetro muy importante igual que el $E^{\circ}\text{redox}$, cuyos valores se muestran en la **Tabla 10**:

Tabla 10. *Tendencia del pH y el $E^{\circ}\text{redox}$ en las muestras*

Muestra	Influencia del pH			Influencia del $E^{\circ}\text{redox}$ (mV)		
	Tamb=25°C	T=50°C	T=80°C	Tamb=25°C	T=50°C	T=80°C
0	4,40	4,55	4,36	345,3	344,9	339,9
1	4,34	4,42	4,30	347,2	347,5	340,6
2	4,30	4,30	4,24	349,5	350,8	342,8
3	4,22	4,24	4,18	354,9	354,7	347,1
4	4,10	4,13	4,03	360,8	358,5	351,5
Extracto 3	4,33			313,0		
HAuCl₄	2,87			927,2		

Los valores de pH muestran una tendencia decreciente a medida que aumenta la concentración de HAuCl₄ en la disolución. Como que el pH de la disolución del ácido es más pequeño que del extracto, a más concentración de HAuCl₄, se acerca cada vez más al pH de la disolución del ácido.

Según la **Tabla 10**, el incremento de la temperatura hasta los 50°C, provoca un aumento del valor de pH de las muestras. A temperatura 80°C, indica una disminución del valor de pH de las muestras.

Entre el potencial de reducción de ambos reactivos (Extracto 1 y HAuCl₄), hay una diferencia significativa, lo que nos asegura que tenga lugar la reacción redox. El potencial de reducción de las muestras presenta una tendencia creciente a medida que aumenta la concentración de HAuCl₄ en la disolución. Se acerca cada vez más al potencial de reducción de la disolución del ácido. En general, el aumento de temperatura hace que la tendencia creciente del potencial de reducción disminuye.

4.4.3.3 Mediante Microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM)

Las fotografías STEM realizadas, muestran nanopartículas de forma esférica con tamaños no homogéneos obtenidas mediante la síntesis verde a un volumen constante del extracto a Tamb. (Figura 46), a T50°C (Figura 47) y a T80°C (Figura 48):

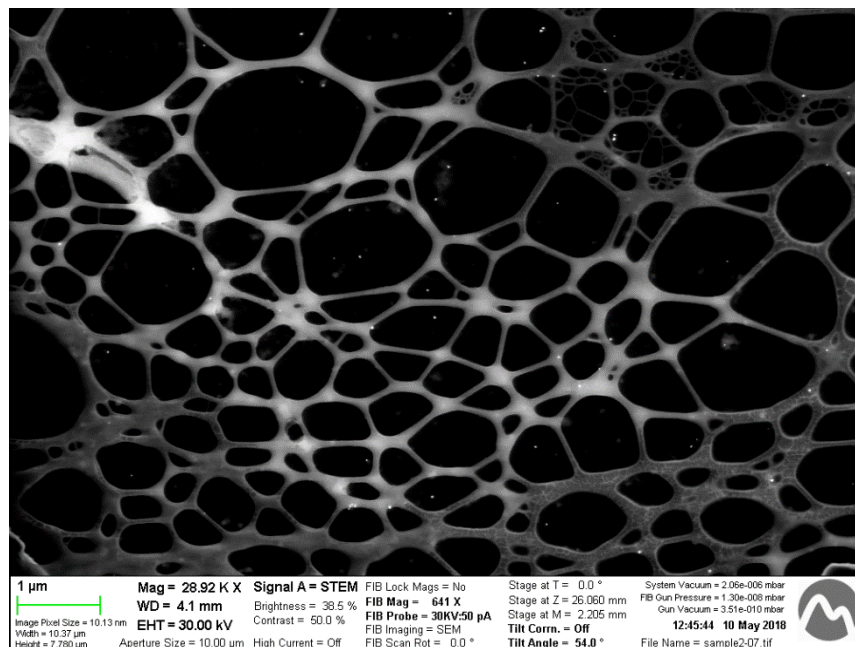


Figura 46. Micrografía STEM de la muestra 4 de AuNPs a Tamb.

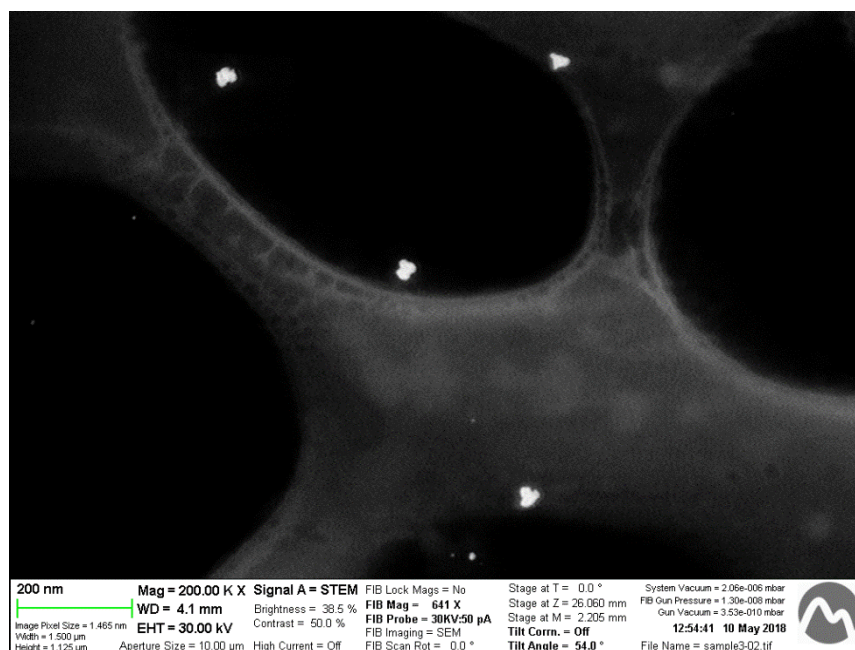


Figura 47. Micrografía STEM de la muestra 4 de AuNPs a T50°C.

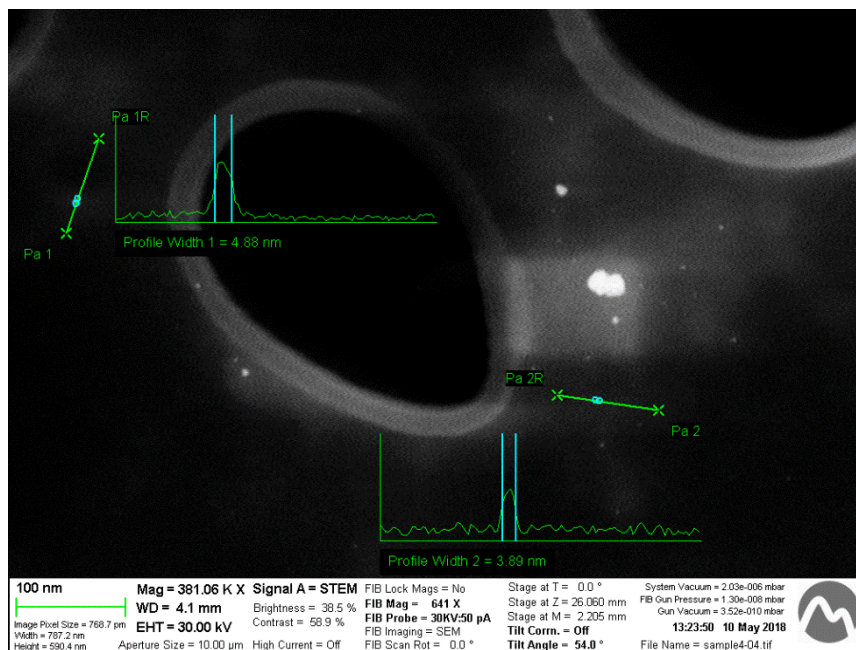


Figura 48. Micrografía STEM de la muestra 4 de AuNPs a T50°C.

De los espectros UV-Vis (Figura 42) y (Figura 45) se comprueba que hay presencia de nanopartículas al presentar un plasmón de resonancia a los 548,7 nm a Tamb. en la muestra 3, a los 541,9,5 nm a Tamb. en la muestra 4, a los 547,0 nm a T50°C en la muestra 4 y a los 534,3 nm a T80°C en la muestra 4. En función a lo analizado en los espectros UV-vis se esperaría que las micrografías de STEM en la muestra 3 a Tamb. y en la muestra 4 a T50°C mostraran nanopartículas de mayor tamaño, como se estima por la localización de su LSPR en el espectro. Mientras que a T80°C se esperarían nanopartículas de un menor diámetro.

Además, parece que existe gran diferencia de los diámetros entre nanopartículas, ya que el pico de la máxima absorbancia muestra mayor anchura. En efecto, existe una distribución que difiere bastante en diámetros, lo que implica una desviación estándar más grande. Lo anterior se comprueba al analizar el histograma de la (Figura 49 y 50).

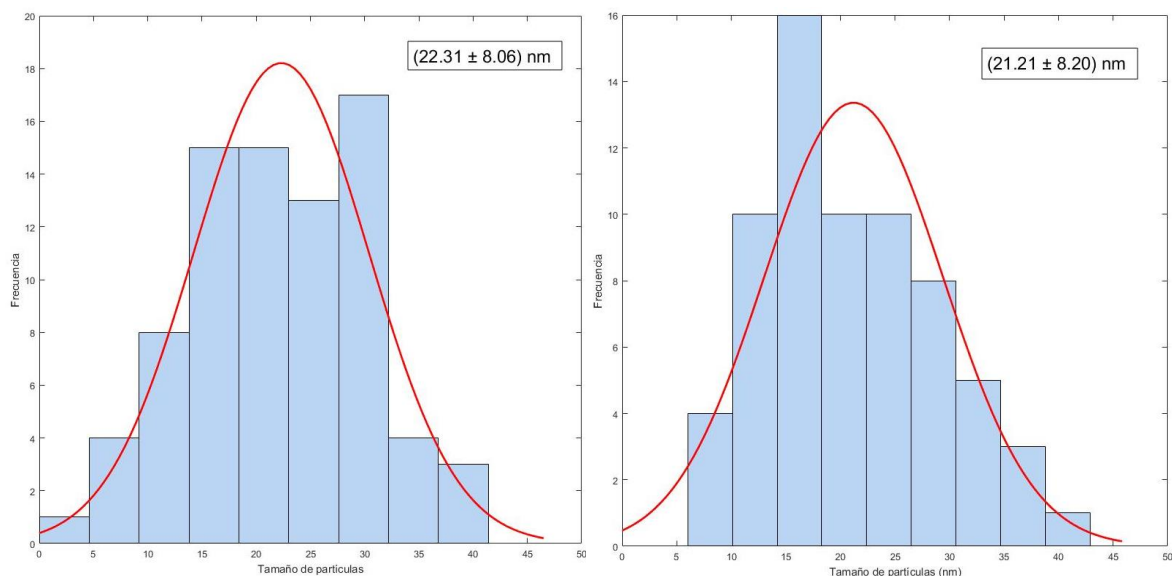


Figura 49. Histograma de AuNPs a Tamb. a) de la muestra 3, b) de la muestra 4

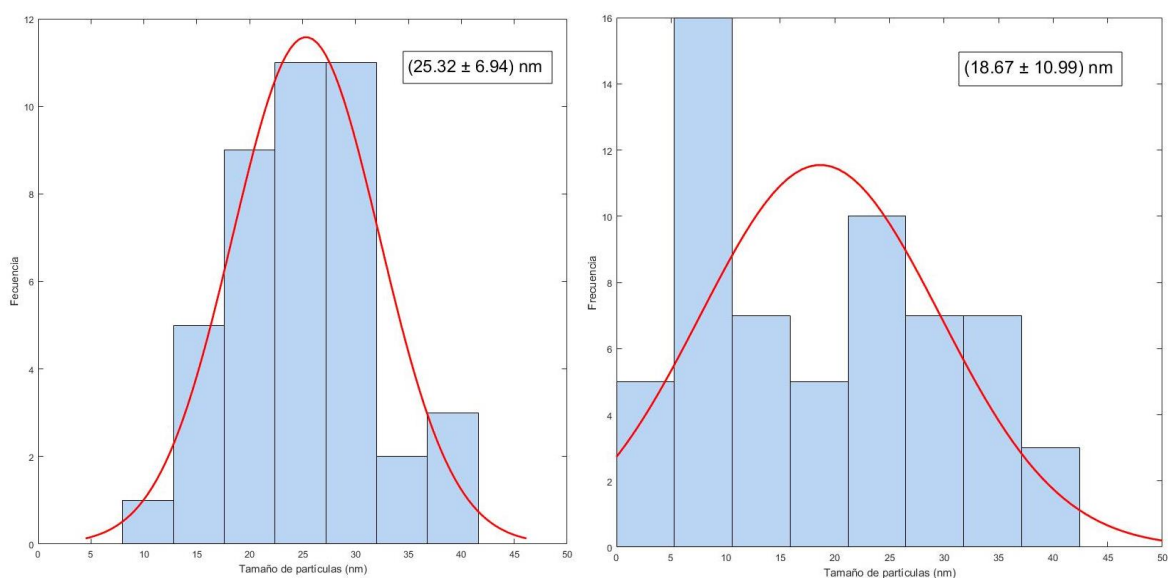


Figura 50. Histograma de la muestra 4 de AuNPs: a) a T50°C, b) a T80°C

Analizando diversas imágenes tomadas mediante STEM, podemos confirmar que dichas nanopartículas presentan un diámetro medio de $22,3 \pm 8,1$ nm en la muestra 3 a Tamb., de $21,2 \pm 8,2$ nm en la muestra 4 a Tamb., de $25,3 \pm 6,9$ nm a T50°C y de $18,7 \pm 11,0$ nm a T80°C. Según los resultados, mayor distribución de tamaños se habrá obtenido la muestra 4 a una T80°C. También se observa que la desviación estándar se mantiene prácticamente constante en las muestras 3 y 4 sintetizadas a la misma temperatura ambiente.

4.4.4 Síntesis a un volumen constante de la disolución de oro a Tamb.

4.4.4.1 Mediante Espectroscopia UV-Vis

Los espectros resultantes para las nanopartículas de oro obtenidas mediante la síntesis verde a un volumen constante de la disolución de HAuCl_4 a temperatura ambiente, se muestran en la (Figura 51):

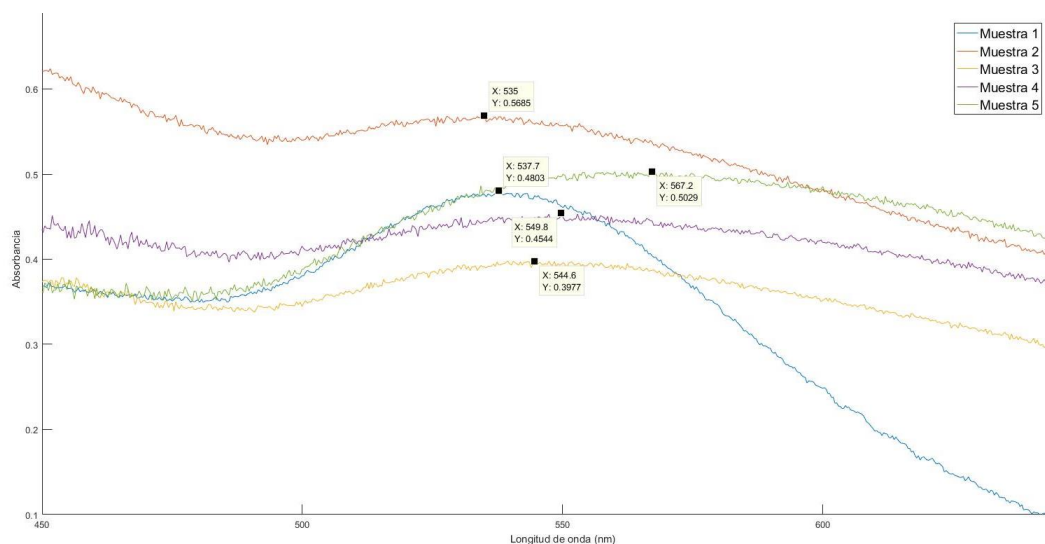


Figura 51. Espectros UV-vis de las muestras a un volumen constante de HAuCl_4 y T_{amb} .

Para cada experimento se han utilizado unas muestras de referencia diferentes (que contienen diferente cantidad de extracto) para calibrar el espectrofotómetro. El factor de dilución utilizado es 1:1 V/V_{total} , se debe a que la absorbancia no es mayor que dos.

El efecto que ejerce el volumen de extracto durante la síntesis se puede observar en el desplazamiento que presenta el máximo de la banda de absorción asociada con la resonancia plasmónica de las nanopartículas de oro (Figura 51). A bajas concentraciones de la disolución del extracto (Muestra 1 y 2), se produce un desplazamiento del plasmón hacia longitudes de onda más pequeñas, con lo cual se puede inferir una reducción en el tamaño de partícula obtenido. Pero a medida que se aumenta la proporción de extracto (Muestra 3, 4 y 5), el máximo del espectro se va desplazando hacia mayores longitudes de onda, y por tanto se produce un aumento en el tamaño de las nanopartículas. El ancho medio de banda aumenta a mayor concentración del extracto sugiriendo un crecimiento de la polidispersidad del sistema.

Los datos de la máxima absorbancia respecto su longitud de onda de la Figura 36, están resumidos en la siguiente tabla:

Tabla 11. Resumen de la máxima absorbancia con su correspondiente longitud de onda

Tipo Extracto	Muestra	Tamb=25°C	
		λ (nm)	Absorbancia
Extracto 3	1	537,7	0,4803
	2	535,0	0,5685
	3	544,6	0,3972
	4	549,8	0,4544
	5	567,2	0,5029

En la (Figura 52), están representadas diferentes concentraciones del HAuCl_4 diluidas 1:4 V/V_{total} debido a la absorbancia mayor que dos. Se puede observar que a mayor concentración del ácido existe un aumento de la absorbancia máxima y su respecta longitud de onda.

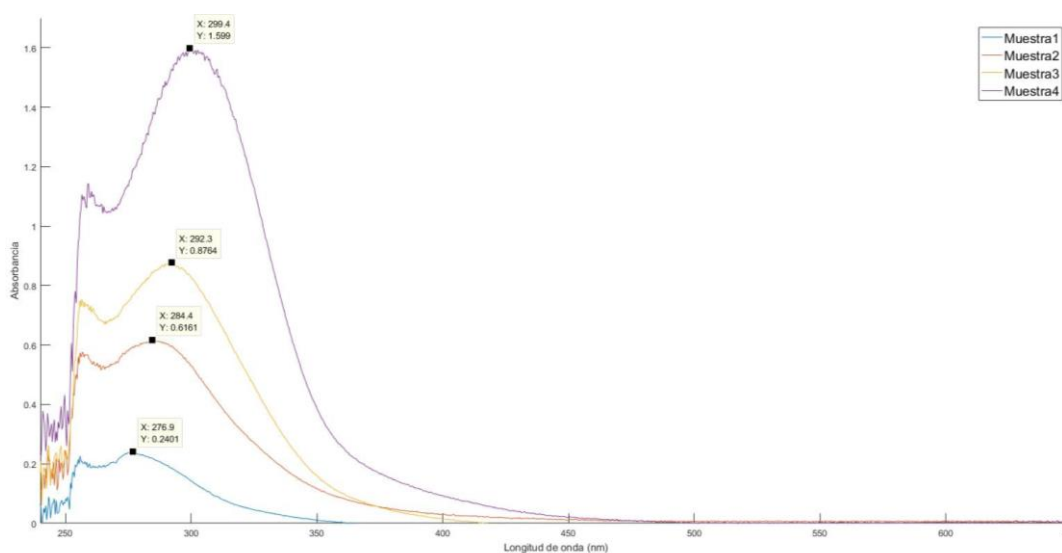


Figura 52. Concentraciones del HAuCl_4 diluidas 1:4 V/V_{total}

La (Figura 53) muestra diferentes concentraciones del extracto diluidas 1:8 V/V_{total} , se debe a que la absorbancia es mayor que dos. En este caso, indica que a medida que se aumenta la proporción de extracto, crece la absorbancia máxima y su respecta longitud de onda.

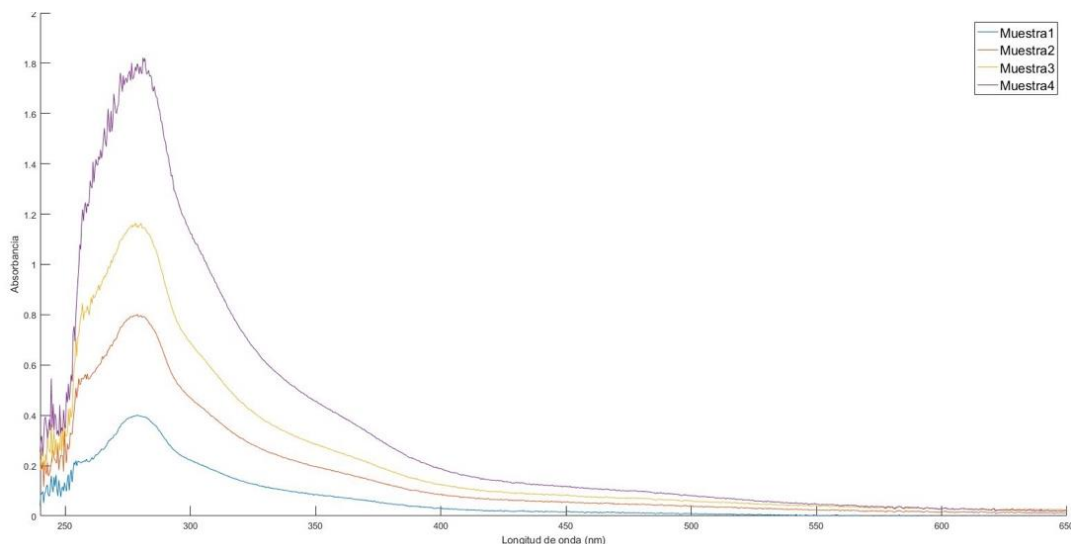


Figura 53. Concentraciones del extracto diluidas 1:8 V/V_{total}

4.4.4.2 Efecto del pH y el potencial de reducción

El pH es un parámetro muy importante igual que el E°_{redox} , cuyos valores se muestran en la **Tabla 12**:

Tabla 12. Tendencia del pH y el E°_{redox} en las muestras

Muestra	Influencia del pH			Influencia del E°_{redox} (mV)		
	Tamb=25°C	Extracto	HAuCl ₄	Tamb=25°C	Extracto	HAuCl ₄
1	3,70	4,66	3,38	376,5	324,9	798,7
2	4,24	4,62	3,16	335,1	320,6	849,8
3	4,37	4,56	3,05	331,2	318,3	872,5
4	4,49	4,50	2,98	324,9	314,2	890,5
Extracto 3	4,33			313,0		
HAuCl₄	2,87			927,2		

Los valores de pH a temperatura ambiente muestran una tendencia creciente a medida que aumenta la concentración del extracto en la disolución. Como que el pH de la disolución del ácido es más pequeño que del extracto, a más concentración del extracto, se acerca cada vez más al pH de la disolución del extracto.

Por otro lado, el pH de las diferentes concentraciones del extracto disminuye a medida que se aumenta la proporción de extracto. El mismo comportamiento se observa con el pH de las diferentes concentraciones del ácido, es decir, se acerca cada vez más al pH de la disolución del ácido.

Entre el potencial de reducción de ambos reactivos (Extracto 1 y HAuCl_4), hay una diferencia significativa, lo que nos asegura que tenga lugar la reacción redox. El potencial de reducción de las muestras a temperatura ambiente presenta una tendencia decreciente a medida que aumenta la concentración de extracto en la disolución. Se acerca cada vez más al potencial de reducción de la disolución del extracto.

El potencial de reducción de la disolución del extracto a diferentes concentraciones disminuye a medida que se aumenta la proporción de extracto. En cambio, el incremento de la concentración de la disolución del ácido hace que aumente el potencial redox acercándose cada vez más al valor del potencial de reducción de la disolución del ácido.

4.4.4.3 Mediante Microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM)

La (Figura 54), (Figura 55) y (Figura 56) muestran las micrografías representativas de STEM de las muestras 1 y 5 obtenidas mediante la síntesis verde a un volumen constante de la disolución de HAuCl_4 y a temperatura ambiente:

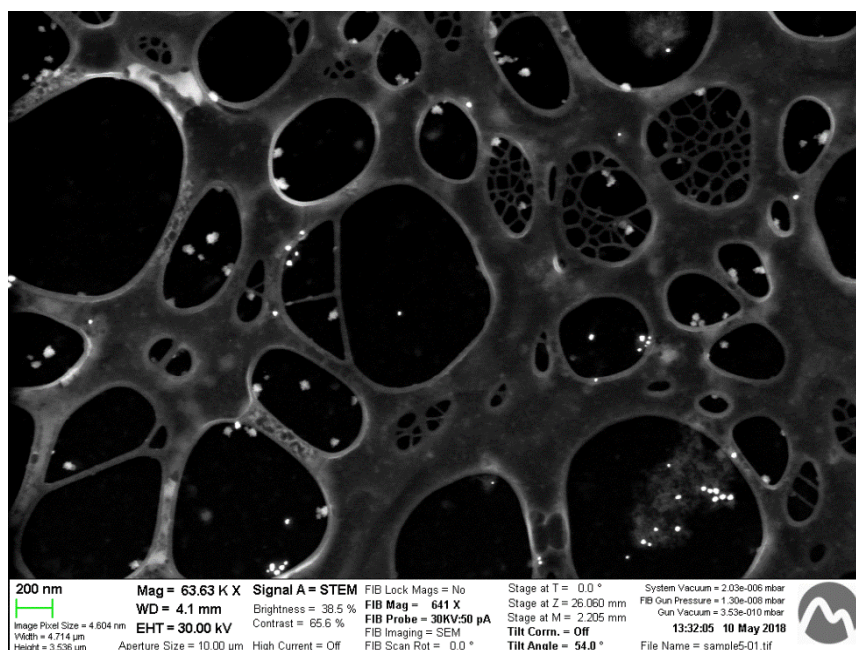


Figura 54. Micrografía STEM de la muestra 1 de AuNPs a Tamb.

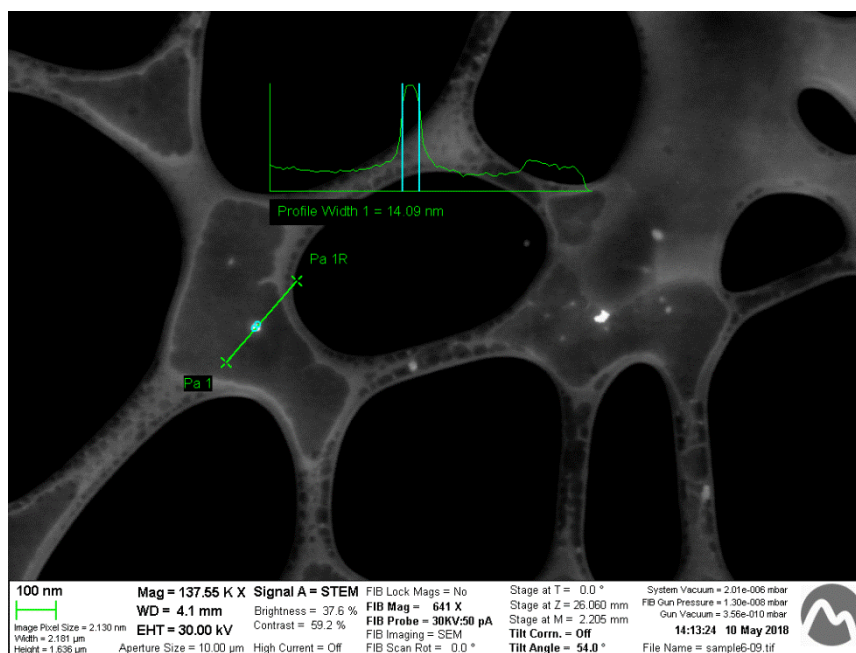


Figura 55. Micrografía STEM de la muestra 5 de AuNPs a Tamb.

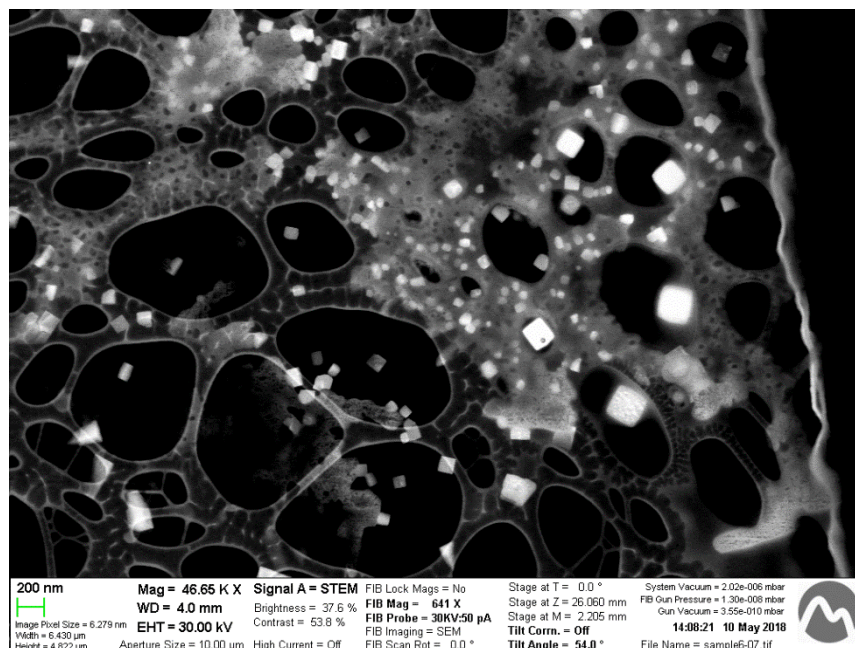


Figura 56. Micrografía STEM de la muestra 5 de AuNPs a Tamb.

Comparando las (Figuras 54 y 55) podemos observar que la muestra 1 presenta una mayor cantidad de nanopartículas de oro debido a que presenta mayor concentración de la disolución del oro. Lo contrario ocurre en la muestra 5, donde se forma menor cantidad de nanopartículas, incluso como señala la (Figura 56), existen partes sin su presencia, puede deberse a que presenta una concentración muy alta del extracto y insuficiente cantidad de oro para dar a cabo la reacción.

Del espectro UV-Vis (Figura 51) se observa que hay presencia de nanopartículas al presentar un plasmón de resonancia a los 537,7 nm en la muestra 1 y a los 567,2 nm en la muestra 5. En función a lo analizado en los espectros UV-vis se esperaría que las micrografías de STEM en la muestra 5 mostraran nanopartículas de mayor tamaño, como se estima por la localización de su LSPR en el espectro. Mientras que para la muestra 1 se esperarían nanopartículas de un menor diámetro.

Además, parece que existe diferencia de los diámetros entre nanopartículas de la muestra 5, ya que el pico de la máxima absorbancia de la muestra 1 es más estrecho. En efecto, existe una distribución que difiere en diámetros, lo que implica una desviación estándar más grande de la muestra 5. Lo anterior se comprueba al analizar el histograma de la (Figura 57).

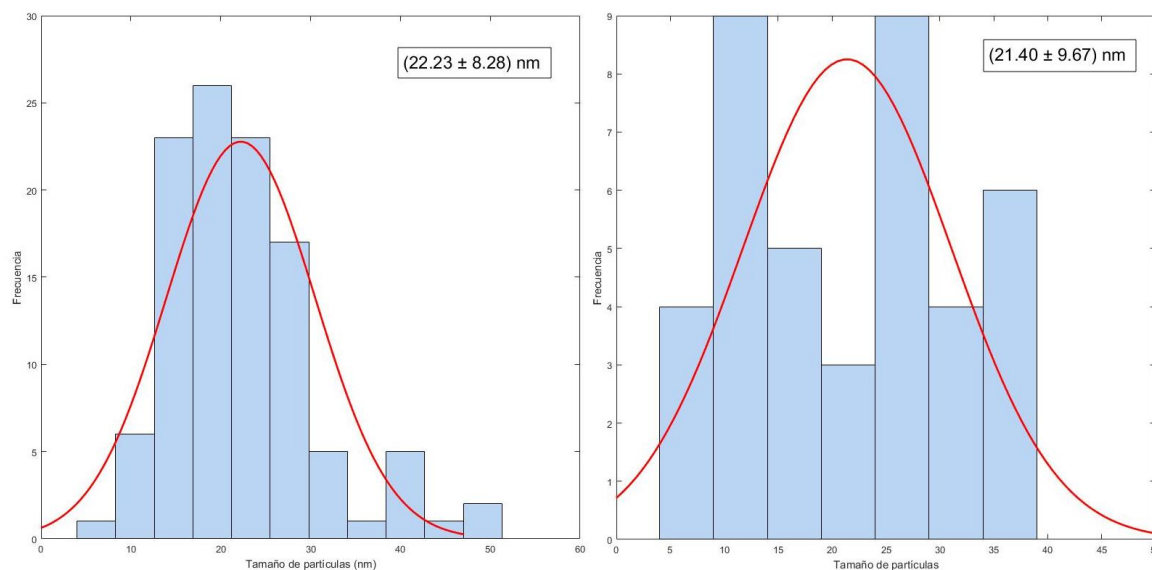


Figura 57. Histograma de AuNPs a Tamb. a) de la muestra 1, b) de la muestra 5

Al comparar los histogramas se puede observar que la muestra 1 con mayor contenido metálico presenta una distribución de tamaño único. Sin embargo, la muestra 5 con menor contenido de oro tiene diferentes tamaños de distribución.

Analizando diversas imágenes tomadas mediante STEM, podemos confirmar que dichas nanopartículas presentan un diámetro medio de $22,2 \pm 8,3$ nm en la muestra 1 y de $21,4 \pm 9,7$ nm en la muestra 5.

4.4.4.4 EDX

El análisis EDX, usando un detector INCA PentaFET-x3 de Oxford Instruments, reveló las nanopartículas de oro, aunque en la (Figura 58) aparecen también otros elementos como el cobre de la rejilla, el aluminio del soporte donde se pone la rejilla y el silicio del detector.

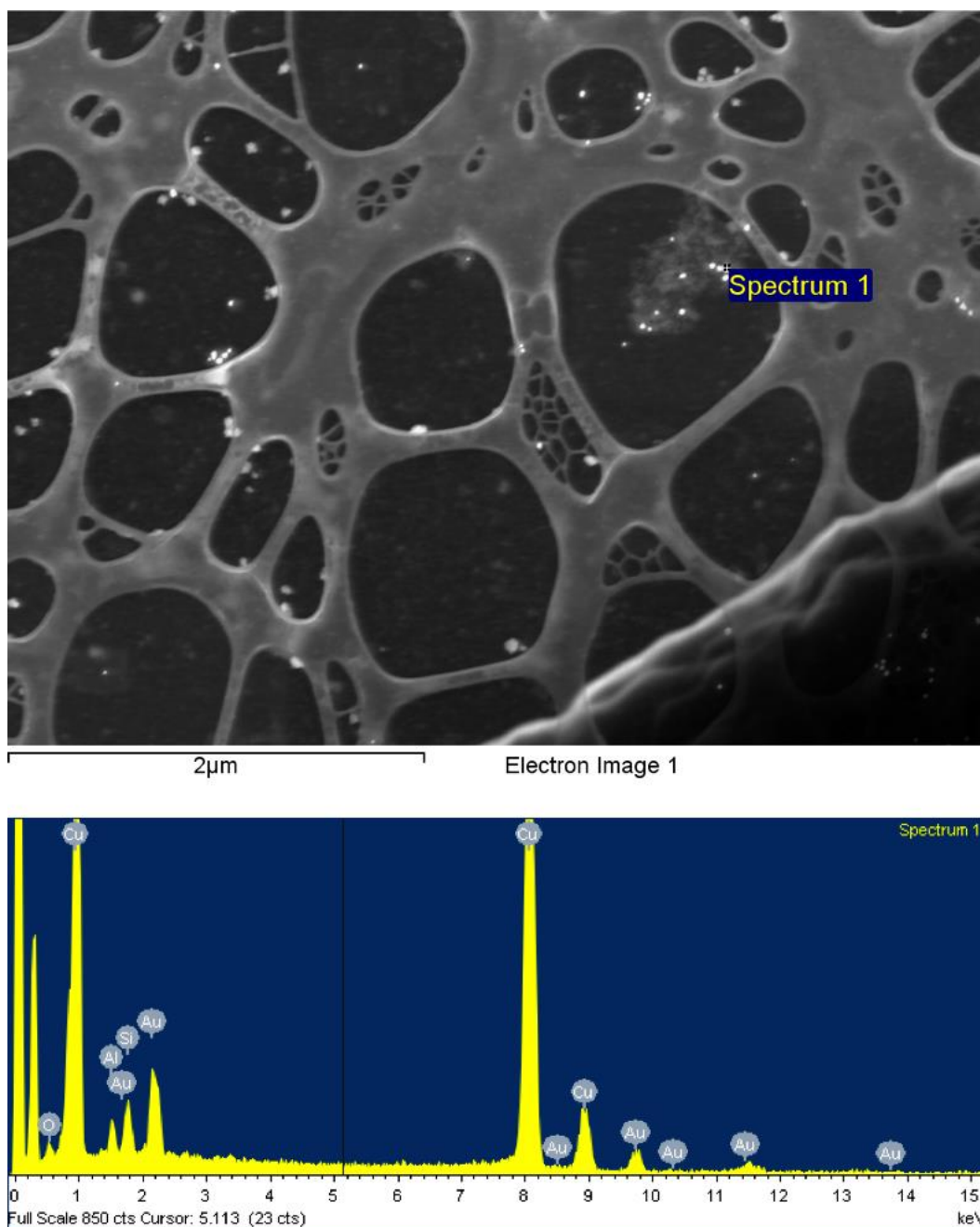


Figura 58. EDX de la muestra 1 de AuNPs a Tamb.

En la (Figura 59), el EDX reveló, aparte de los elementos mencionados anteriormente, cloruro potásico que se ha formado debido a la alta concentración del extracto.

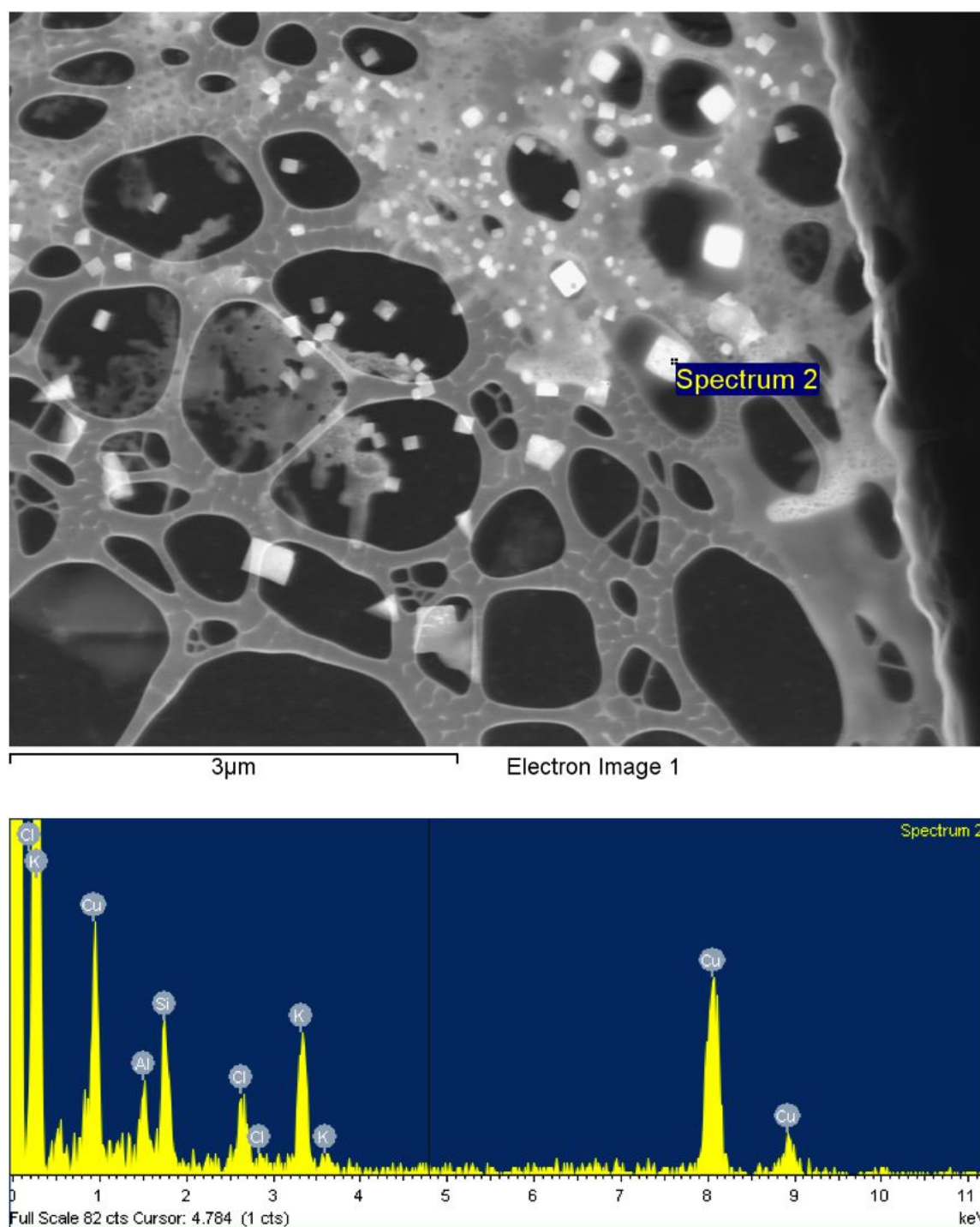


Figura 59. EDX de la muestra 5 de AuNPs a Tamb.

4.5 Determinación de polifenoles en extracto de raspo de uva

La cuantificación de polifenoles se llevó a cabo con el reactivo Follin-Ciocalteu, siguiendo el método de equivalentes de ácido gálico (GAE). Con este método, se determina colorimétricamente la cantidad de compuestos reductores en mg/l de ácido gálico equivalentes (2).

4.3.1 Reactivos, material e instrumentación

- Reactivos:

Ácido gálico (titration) SIGMA, Reactivo Folin-Ciocalteu (titration) PanReac, Carbonato de sodio anhidro (ACS) Merck, agua destilada.

- Material e instrumentación utilizados:

Matraces aforados de 10 ml, 25ml, 50 ml, Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible, Espátula de metal, Balanza analítica, Guantes, Pesasustancias.

- Disoluciones de partida:

Disolución de ácido gálico de concentración 2000 mg/L: Disolver 0.1 g del sólido en 50 mL de agua destilada

Disolución de carbonato de sodio (10% en peso): Disolver 5 g del sólido en 50 mL de agua destilada

4.3.2 Procedimiento experimental

- 1) En primer lugar, para la determinación de polifenoles se debe realizar una recta de calibrado con diferentes patrones. A partir de la disolución de ácido gálico se prepararon, en matraces de 10 ml, los patrones de ácido gálico: 800, 1000, 1200, 1400 y 1800 mg/L.
- 2) Se colocaron 0,2 mL de patrones de diferentes concentraciones de ácido gálico (o agua destilada en caso del blanco) o muestras de extracto en matraces de 10 mL, se añadieron 4 mL de agua destilada y 1,2 mL del reactivo Folin-Ciocalteu en cada uno de ellos.
- 3) Pasados 5 minutos, se añadieron 1,8 mL de la disolución de carbonato de sodio en cada uno de los matraces, se enrasó con agua destilada hasta los 10 mL y se dejaron reposar 2 horas antes de su análisis. De este paso se obtuvieron muestras y patrones diluidos en matraz, siendo el patrón 1 el de menor concentración, y el 5 el de mayor (Figura 60).

- 4) Una vez pasadas 2 h, las disoluciones son analizadas en el espectrofotómetro Uv-Vis a una longitud de onda fija que se determinó en el punto de absorbancia máxima a 777 nm.

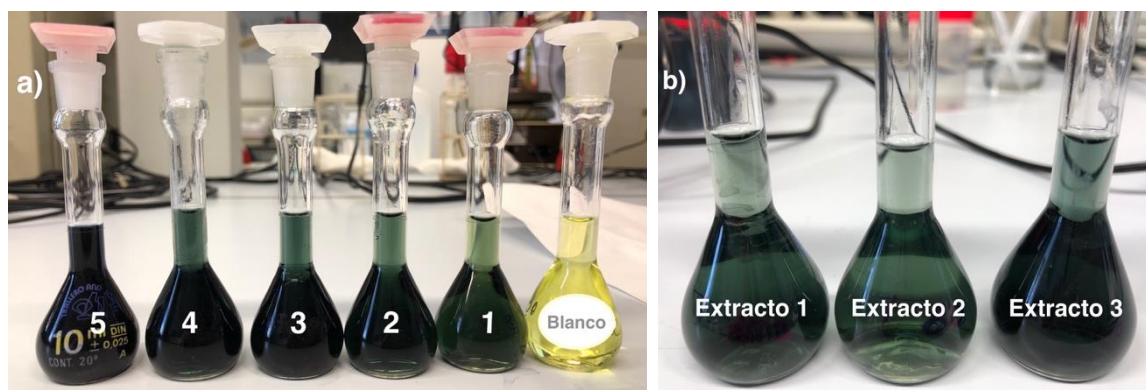


Figura 60. a) Patrones de ácido gálico para obtener la recta de calibrado,
b) Muestras del extracto para analizar los polifenoles.

Los patrones de ácido gálico y las muestras del extracto diluidos en matraz se tuvieron que diluir nuevamente en agua destilada por su elevada absorbancia (Absorbancia > 2). Esta última dilución con agua destilada fue de 1:5 V/V_{total} para los patrones de ácido gálico (Figura 28) y de 1:2 V/V_{total} para las muestras del extracto.

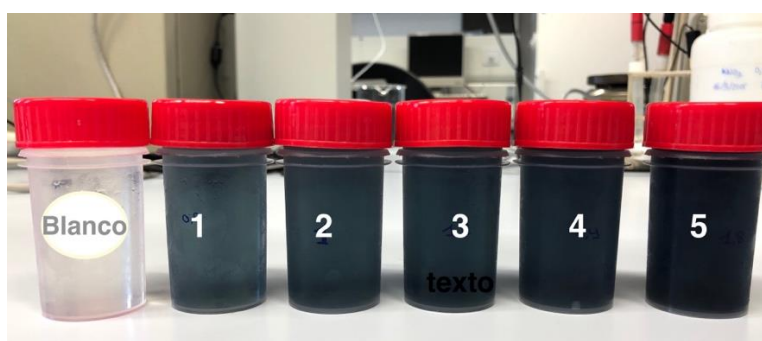


Figura 61. Patrones de ácido gálico diluidos 1:5 V/V_{total}

4.3.3 Recta de calibrado mediante espectroscopia UV-Vis

La **Tabla 13** muestra los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones de los patrones.

Tabla 13. Absorbancia en función de la concentración de ácido gálico a una longitud de onda de 777 nm.

Longitud de onda 777 nm				
Patrón	Concentración Inicial (mg/L ácido gálico)	Concentración Diluida en Matraz (mg/L ácido gálico)	Concentración Diluida 1:5 V/V _{total} (mg/L ácido gálico)	Absorbancia
1	800	16	3,2	0,38887
2	1000	20	4	0,47104
3	1200	24	4,8	0,56048
4	1400	28	5,6	0,65349
5	1800	36	7,2	0,83081

La segunda columna hace referencia a los patrones de diferentes concentraciones de ácido gálico (volumen 0,2 mL). La tercera columna señala la concentración de ácido gálico existente en cada matraz aforado de 10 mL y se calcula mediante la **Ecuación 1**. La cuarta columna indica la concentración de ácido gálico en cada matraz una vez diluido 1:5 V/V_{total}, es decir, después de ser disuelta en 4 volúmenes idénticos de agua destilada, se calcula mediante la **Ecuación 2**. Y la quinta corresponde a la absorbancia de los patrones una vez diluidos.

$$\text{Concentración diluida en Matraz} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \text{Concentración inicial} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) * \frac{0,2}{10} \quad \text{Ec.1}$$

$$\text{Concentración diluida 1:5} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \text{Concentración diluida en Matraz} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) * \frac{1}{5} \quad \text{Ec.2}$$

Las rectas de calibrado, con un muy buen ajuste, como indica la ecuación de la regresión lineal obtenida, se puede observar en la (Figura 62):

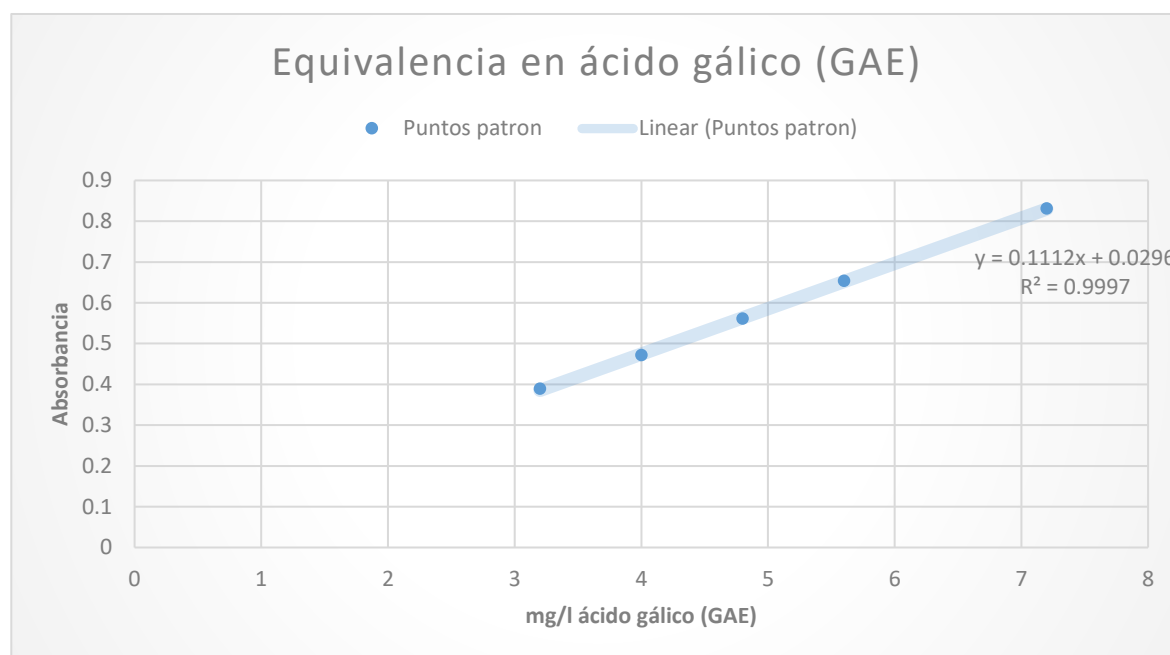


Figura 62. Recta de calibrado que relaciona la absorbancia de cada patrón con su contenido real en polifenoles (equivalentes en ácido gálico).

4.3.4 Concentración de polifenoles en extracto

A partir de la absorbancia de cada extracto obtenida (Tabla 14), se calculó la concentración de ácido gálico equivalente que tenía el extracto.

Tabla 14. Contenido en polifenoles de cada extracto obtenido a partir de la recta de calibración y las disoluciones correspondientes

Extracto	Absorbancia	Concentración diluida (mg/L)	Concentración polifenoles (mg/L)
1	0,99019	8,6	863,8
2	0,76096	6,6	657,7
3	0,81702	7,1	708,1

La concentración diluida se calcula a partir de la ecuación de la regresión lineal de la recta de calibrado anterior según la fórmula de la **Ecuación 3**. Como que las muestras de extracto se elaboraron de manera similar, simplemente se substituyeron los 0,2 ml de patrón por 0,2 ml del respectivo extracto en el matraz de 10 ml y se han diluido 1:2 V/V_{total} para medir su absorbancia puesto que ésta debe tener un valor situado dentro del rango de linealidad de la recta de calibrado, la concentración de polifenoles se calcula a partir de la concentración diluida mediante la **Ecuación 4**.

$$\text{Concentración diluida} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Absorbancia} - 0,0296}{0,1112} \quad \text{Ec.3}$$

$$\text{Concentración polifenoles} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \text{Concentración diluida} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) * \frac{10}{0,2} * 2 \quad \text{Ec.4}$$

Aunque el material y procedimiento experimental de la síntesis del extracto a partir del raspo de uva han sido los mismos, el contenido de los polifenoles de los tres extractos sintetizados varía. Esto puede deberse a pérdidas de vapor producidas que ha provocado la corriente de refrigeración en la etapa de extracción por reflujo. Cuanto más vapor pierde más concentrado es el extracto. Por otro lado, con la utilización de los filtros de 0,2 µm se pierde una parte del extracto ya que se queda parte del líquido en los filtros, provocando así, una lógica disminución de los polifenoles.

Conclusiones

En la síntesis de nanopartículas de oro a partir del extracto de raspo de uva se ha comprobado mediante espectroscopia de UV-Vis que cuanto más cantidad de disolución de oro se añade al extracto, mayor cantidad de nanopartículas se obtienen con una distribución de tamaño único. Sin embargo, cuanto más cantidad de extracto se añade a la disolución de oro, menor cantidad de nanopartículas se obtienen con diferentes tamaños de distribución.

El tiempo en la síntesis de las nanopartículas de oro hace aumentar la intensidad de la absorción en los espectros de UV-vis, por lo que podemos deducir que se produce un aumento en la concentración de nanopartículas de la disolución coloidal y se produce un desplazamiento del plasmón hacia longitudes de onda más pequeñas, con lo cual se puede inferir una reducción en el tamaño de partícula obtenido. No obstante, esta ligera variación con el tiempo puede deberse a variaciones en la calibración del equipo.

Los valores de pH muestran una tendencia decreciente a medida que aumenta la concentración de HAuCl_4 en la disolución. Como que el pH de la disolución del ácido es más pequeño que del extracto, a más concentración de HAuCl_4 , se acerca cada vez más al pH de la disolución del ácido. El incremento de la temperatura hasta los 50°C , provoca un aumento del valor de pH de las muestras. Pero a temperatura 80°C , indica una disminución del valor de pH de las muestras.

Entre el potencial de reducción de ambos reactivos (Extracto y HAuCl_4), hay una diferencia significativa, lo que nos asegura que tenga lugar la reacción redox. El potencial de reducción de las muestras presenta una tendencia creciente a medida que aumenta la concentración de HAuCl_4 en la disolución. Se acerca cada vez más al potencial de reducción de la disolución del ácido. El aumento de temperatura hace que la tendencia creciente del potencial de reducción disminuya.

Aunque el material y procedimiento experimental de la síntesis del extracto a partir del raspo de uva han sido los mismos, el contenido de los polifenoles de los tres extractos sintetizados varía. Esto puede deberse a pérdidas de vapor producidas que ha provocado la corriente de refrigeración en la etapa de extracción por reflujo. Cuanto más vapor pierde más concentrado es el extracto.

En función a lo analizado en los espectros UV-vis las muestras a temperatura ambiente y a 50°C mostraran nanopartículas de mayor tamaño, como se estima por la localización de su LSPR en el espectro. Mientras que a 80°C las nanopartículas presentan un menor diámetro. Por lo tanto, podemos concluir que, en aumentar la temperatura hasta los 50°C , existe una tendencia creciente del tamaño de nanopartícula, lo que no pasa a temperatura 80°C . Es decir, altas temperaturas implican un

menor tamaño. Este corrimiento a longitudes de onda menor, indican que el proceso de nucleación se incrementa y el crecimiento disminuye.

Comparando todos los resultados obtenidos con las distintas técnicas microscópicas avanzadas de caracterización, se puede concluir que la técnica de microscopía más óptima para determinar el tamaño y distribución de las nanopartículas de oro es la microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM). A partir de dicho análisis, se ha observado que utilizando mayor concentración del extracto se obtiene menor cantidad de nanopartículas con diferentes tamaños de distribución.

Presupuesto económico

Concepto	Cantidad	Coste unitario	Coste
Empleados			
Ingeniero	450 horas	27 €/h	12150 €
Técnico	250 horas	15 €/h	3750 €
Programas informáticos			
Matlab	1 Licencia anual	250€/Licencia anual	250 €
Microsoft Office	1 Licencia anual	99 €/Licencia	99 €
Uso de instrumentos de análisis			
STEM	8 horas	500€/h	4000 €
Espectrofotómetro	25 horas	20€/h	500 €
Material de laboratorio			
Reactivos			700 €
Herramientas			300 €
		Total	21749 €

Bibliografia

- (1) Cristina Arenas. Síntesis de nanopartículas metálicas a partir de extracto de raspo de uva. September of 2017. Department of Chemical Engineering of Barcelona Est Engineering School. (EEBE), UPC.
- (2) N. Gerits, "Synthesis of copper nanoparticles using grape stalk and spent coffee extract," p. 93, 2016. Incoming Exchange Student-Final Degree Project.UdG. [<https://dugidoc.udg.edu/bitstream/handle/10256/13232/u1937385.pdf?sequence=1>, 14th of january, 2017]
- (3) A. M. Huánuco Ramos, "Estudio de la recuperación de metales mediante la síntesis de nanopartículas metálicas: CuProjecte Final de Màster Oficial UPC 2017. [<https://upcommons.upc.edu/browse?value=Hu%C3%A1nuco+Ramos%2C+Aar%C3%B3n+Miguel&type=author>, 14th of January, 2017]
- (4) Dowling, A., Clift, R., Grobert, N. & Hutton, D. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. R. Soc. (2004).
- (5) Horikoshi Satoshi and Nick Serpone. Introduction to nanoparticles, chapter 1. 2013.
- (6) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Mélanie Auffan, Jérôme Rose, Jean-Yves Bottero, Gregory V. Lowry, Jean-Pierre Jolivet y Mark R. Wiesner. 2009, Nature Nanotechnology, págs. 634 - 641.
- (7) R. H. Brill. The chemistry of the lycurgus cup. VII e Congrès International du Verre, 2(223):1-13, 1965.
- (8) Ian Freestone, Nigel Meeks, Margaret Sax, and Catherine Higgitt. The lycurgus cup - a roman nanotechnology. Gold Bulletin, 40(4):270-277, 2007.
- (9) Zeeya Merali. This 1600-years-old goblet shows that the romans were nano- technology pioneers: Researchers have finally found out why the jade-green cup appears red when lit from behind. Smithsonian Magazine, September 2013.
- (10) Faraday, Michael. Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. [ed.] Royal Society of London. s.l. : Philos. págs. 145-181. Vol. 147 (1857).

- (11) John Turkevich, Peter C. Stevenson, and J. Hillier. The formation of colloidal gold. *Journal of Physical Chemistry*, 57(7):670–673, March 1953.
- (12) Dykman, L. & Khlebtsov, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2256 (2012).
- (13) Zeng, S., Baillargeat, D., Ho, H.-P. & Yong, K.-T. Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications. *Chem. Soc. Rev.* 43, 3426–52 (2014).
- (14) Huang, X. & El-Sayed, M. A. Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT). *Alexandria J. Med.* 47, 1–9 (2011).
- (15) Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J. & Wyatt, M. D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 1, 325–7 (2005).
- (16) Wang, L.-S. Covalent gold. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 8694–8705 (2010).
- (17) Shiringirishi, M., Prajapati, S., Yadav, P. & Verma, A. Gold nanoparticles: Promising and potential nanomaterial. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 4, 4068–4082 (2013).
- (18) Higby G.J. Gold in medicine: A review of its use in the west before 1900. *Gold Bull.* 1982;15(4):130-40.
- (19) Jain P.K., Huang X., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc Chem Res.* 2008;41(12):1578-1586.
- (20) Chen P.C., Mwakwari S.C., Oyelere A.K. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnol Sci Applications.* 2008;1(1): 45-66.
- (21) Han G., Martin C.T., Rotello V.M. Stability of gold nanoparticle-bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem Biol Drug Des.* 2006;67(1):78-82.
- (22) Hong R., Han G., Fernandez J.M., Kim B.J., Forbes N.S., Rotello V.M. Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J Am Chem Soc.* 2006;128(4):1078-1079

- (23) Chaudhry Q., Scotter M., Blackburn J., Ross B., Boxall A., Castle L., Aitken R., Watkins R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2008;25(3):241-258.
- (24) Robinson D.K.R., Morrison M.J. Nanotechnologies for food packaging: Reporting the science and technology research trends: Report for the Observatory NANO; 2010 Aug.
- (25) Subramanian V., Frechet J.M.J., Chang P.C., Huang D.C., Lee J.B., Molesa S.E., Murphy A.R., Redinger D. R. Progress toward development of all-printed RFID tags: Materials, processes, and devices. Proc. of the IEEE. 2005;93:1330-1338.
- (26) Torralba Cadena, Lourdes de Jesús. (2017). Estudio de la modificación de electrodos comerciales serigrafiados de nanofibras de carbono, con nanopartículas de plata para la detección de Pb²⁺ y Cd²⁺ en disoluciones acuosas. Barcelona.
- (27) Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. Biotechnology Advances, 31(2), 346–356. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
- (28) Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. Jingfang Zhou, John Ralston, Rossen Sedev, David A. Beattie. s.l. : Elsevier, 2009, Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 331, págs. 251-262.
- (29) Muñoz, Mario German Friederici. Nanopartículas de Au y Pd: síntesis, funcionalización y aplicaciones catalíticas. Barcelona : Universitat de Barcelona, 2013.
- (30) Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlado forma y tamaño. Zanella, Rodolfo. [ed.] Mundo nano. 1, enero-junio 2012, Vol.5.
- (31) Nanopartículas de plata:métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. Monge, Miguel. 1, 2009, Anales de la Real Sociedad Española de Química , págs. 33-41.
- (32) Preoperación de nanopartículas de plata en ausencia de polimeros estabilizantes. Ángela B. Sifontes, Luis Melo*, Carlos Maza, Juan J. Mendes y Marta Mediavilla. 6, 2010, Quim. Nova,, Vol. 33, págs. 1266-1269.
- (33) Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss. Faraday Soc. 11, 55 (1951).
- (34) Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. Nature 241, 20–22 (1973).

- (35) Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid?Liquid system. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 801 (1994).
- (36) Martin, M. N., Basham, J. I., Chando, P. & Eah, S.-K. Charged gold nanoparticles in non-polar solvents: 10-min synthesis and 2D self- assembly. *Langmuir* 26, 7410–7 (2010).
- (37) Navarro, J. R. G., Lerouge, F., Cepraga, C., Baldeck, P. L. & Parola, S. Nanocarriers with ultrahigh chromophore loading for fluorescence bio-imaging and photodynamic therapy. *Biomaterials* 34, 8344–51 (2013)
- (38) Tue Anh, N., Van Phu, D., Ngoc Duy, N., Duy Du, B. & Quoc Hien, N. Synthesis of alginate stabilized gold nanoparticles by γ -irradiation with controllable size using different Au³⁺ concentration and seed particles enlargement. *Radiat. Phys. Chem.* 79, 405–408 (2010).
- (39) Huang, C.-J., Chiu, P.-H., Linn, J.-J. & Yang, C.-F. Electrochemically Controlling the Size of Gold Nanoparticles. *J. Electrochem. Soc.* 153, D193 (2006).
- (40) Dong, S.-A. & Zhou, S.-P. Photochemical synthesis of colloidal gold nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. B* 140, 153–159 (2007).
- (41) Correard, F., Al-Kattan, A., Gingras, M., Kabashin, A. V & Braguer, D. Gold nanoparticles prepared by laser ablation in aqueous biocompatible solutions: assessment of safety and biological identity for nanomedicine applications. *Int. J. Nanomedicine* 9, 5415–30 (2014).
- (42) Armendariz, V., Parsons, J. G., Jose-Yacaman, M. & Gardea- Torresdey, J. L. The extraction of gold nanoparticles from oat and wheat biomasses using sodium citrate and cetyltrimethylammonium bromide, studied by x-ray absorption spectroscopy, high-resolution transmission electron microscopy, and UV-visible spectroscopy. *Nanotechnology* 20, 105607 (2009).
- (43) Reddy, A. S., Chen, C.-Y., Chen, C.-C., Fan, C.-W. & Wang, J.-C. Biological synthesis of gold and silver nanoparticles mediated by the bacteria *Bacillus subtilis*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10, 6567–74 (2010).
- (44) Ramsden, J. (2011). *Nanotechnology: An Introduction (Micro and Nano Technologies)*.
- (45) Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Talianky, M. E., & Kalinina, N. O. (2014). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*, 6(1 (20)), 35–44. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3999464/?tool=pmcentrez>

- (46) M. Awwad, A., M. Salem, N., & O. Abdeen, A. (2013). Biosynthesis of Silver Nanoparticles using *Olea europaea* Leaves Extract and its Antibacterial Activity. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2(6), 164–170. <http://doi.org/10.5923/j.nn.20120206.03>
- (47) Mehranpour, H., Askari, M., Ghamsari, M. S., & State, S. (2012). LaMer theory approach to study the nucleation and growth of sol-gel derived TiO₂ nanoparticles. *Proceedings of the 4th International Conference on Nanostructures (ICNS4)*.
- (48) Kharissova, O. V., Dias, H. V. R., Kharisov, B. I., P?rez, B. O., & P?rez, V. M. J. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 31(4), 240–248. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.003>
- (49) García Martínez, Eva; Fernández Segovia, Isabel & Fuentes López, Ana. Determinación de polifenoles totales por el método de FolinCiocalteu. Valencia.
- (50) Método Folin Ciocalteu. <https://documents.mx/documents/metodo-folin-ciocalteu.html>
- (51) RSC Royal Society of Chemistry. Spectroscopy in a suitcase, 2006. URL: <http://www.rsc.org/learn-chemistry/resource/res00000280/spectroscopy-in-a-suitcase-resources>. xiii, 8, 9
- (52) Ocean Optics. (2015). Flame Miniature Spectrometer User Manual.
- (53) K. S. Mayya, V. Patil, and Murali Sastry. On the stability of carboxylic acid derivatized gold colloidal particles the role of colloidal solution ph studied by optical absorption spectroscopy. *Langmuir*, 13(15):3944–3947, 1997. 10, 18
- (54) Microscopía electrónica. <http://www2.uned.es/cristamine/mineral/metodos/tem.htm>
- (55) Why STEM not TEM? [http://www.spectral.se/spectral.nsf/f164f3e9b82f0febc1256dcc004611c1/d4a98a973f4e0290c12571e300376e06/\\$FILE/208%20Why%20STEM%20Not%20TEM.pdf](http://www.spectral.se/spectral.nsf/f164f3e9b82f0febc1256dcc004611c1/d4a98a973f4e0290c12571e300376e06/$FILE/208%20Why%20STEM%20Not%20TEM.pdf)
- (56) Materials Evaluation and Engineering, Inc. (2001). Handbook of Analytical Methods for Materials: Practical Solution to Materials Problems through Technology and Innovation. Inglaterra.
- (57) Cantoni, M. (2010). Electron Microscopy. Experimental Methods in Physics. Retrieved from <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=55317177d685cc7f748b45d9&assetKey=AS%3A273759599038468%401442280782372>

(58) Laarbi, Omar. (2016). Procedimientos de trabajo en un laboratorio de biosorción de metales y monitorización de procesos. Barcelona

(59) Mata, R., Bhaskaran, A. y S. Sadras. (2015). "Green-synthesized gold Nanoparticles from Plumeria alba flower extract to augment catalytic degradation of organic dyes and inhibit bacterial growth". Particuology.